

Impressão 3D em Biologia, Medicina e Odontologia

Janaina Dernowsek, PhD

Pesquisadora colaboradora do CTI Renato Archer

www.biofabricação.com

jadernowsek@gmail.com



Bio3Data

Idealizadora

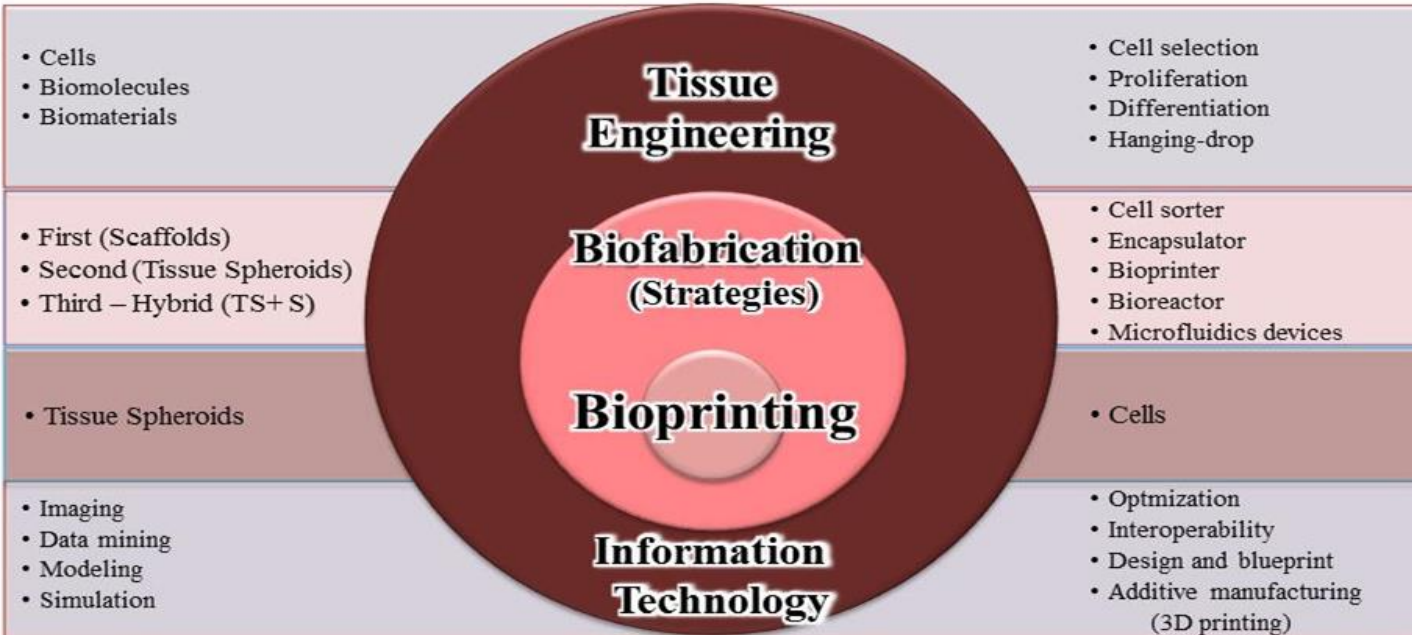
bio3data@gmail.com

Tópicos

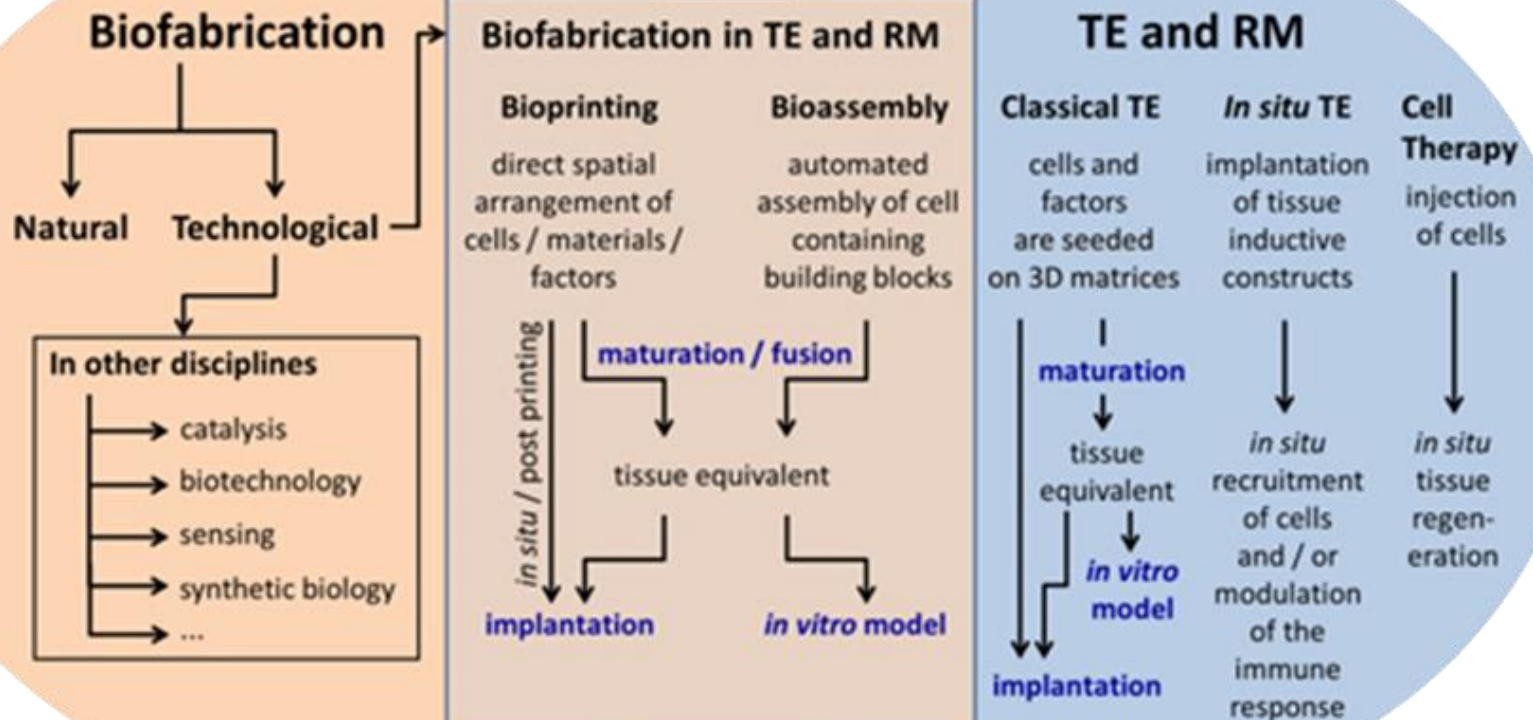
- O que é Biofabricação e Bioimpressão de tecidos;
- O que é Bioink/Biotinta;
- Tecnologias envolvidas;
- O papel da tecnologia da informação na bioimpressão de tecidos;
- Projetos desenvolvidos no Brasil e no mundo sobre bioimpressão de tecidos.
 - Tecido cardíaco, ósseo, cartilaginoso, “córnea”, músculo, pele, tireoide, ligamentos...
- Modelagem e Simulação Computacional na bioimpressão.



Centro de
Tecnologia da
Informação
Renato Archer



O que é Bioimpressão



Etapas da Bioimpressão

Today

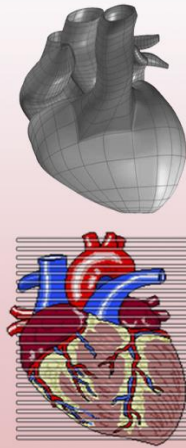
Virtual

Acquisition of
3D patient
model



MRI

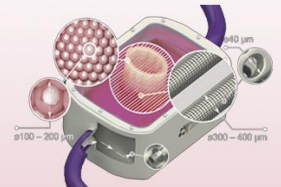
BioCAD - Design



3D Bioprinting



Post processing
Bioreactor



Etapas da Bioimpressão com estudos prévios in silico

In silico

Next steps

BioCAE
Modeling and Simulations

Cell source
Physical
Chemical
Biological
Topography

→ Stimuli

BioCAD

Time

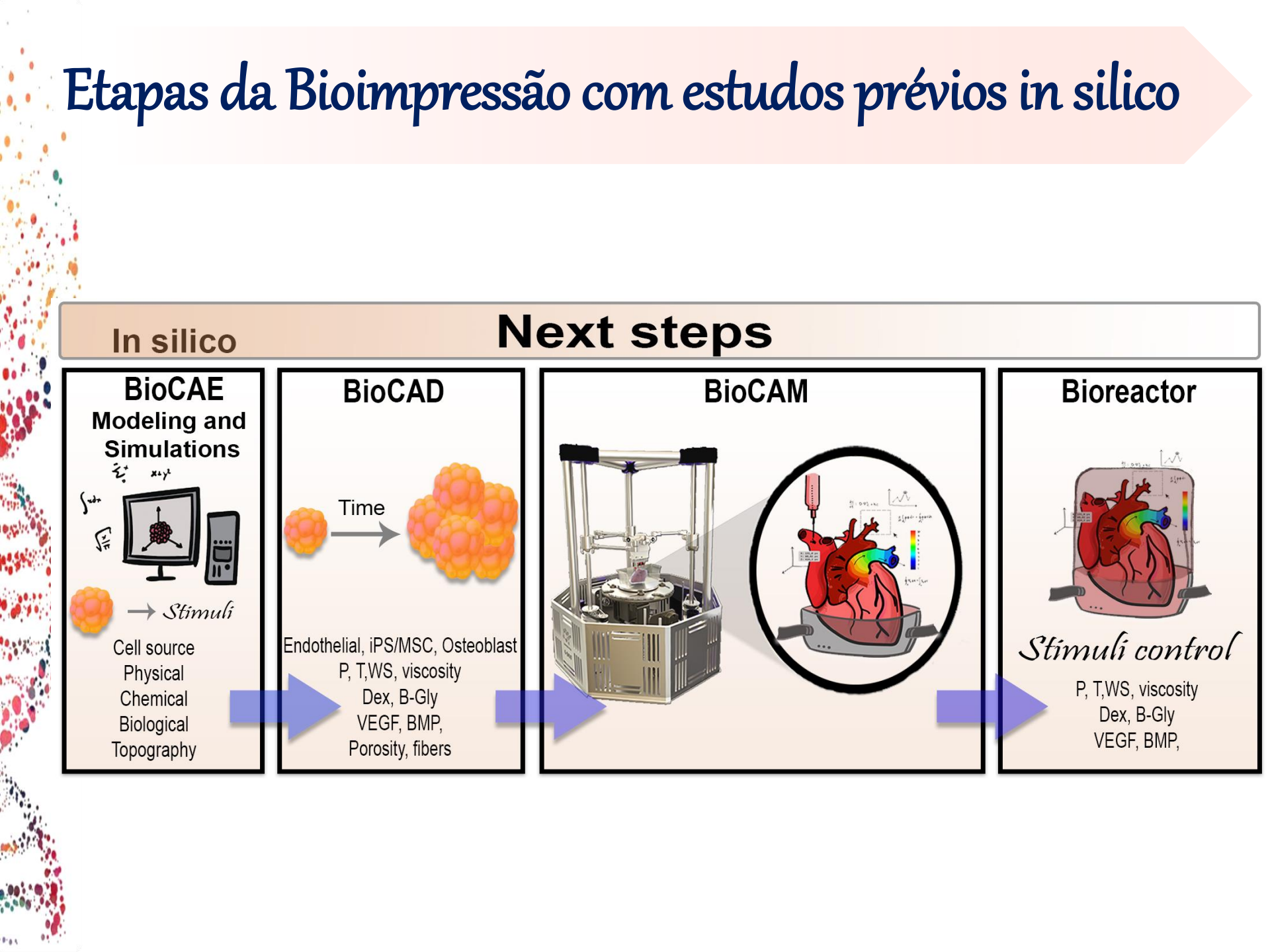
Endothelial, iPS/MSC, Osteoblast
P, T, WS, viscosity
Dex, B-Gly
VEGF, BMP,
Porosity, fibers

BioCAM

Bioreactor

Stimuli control

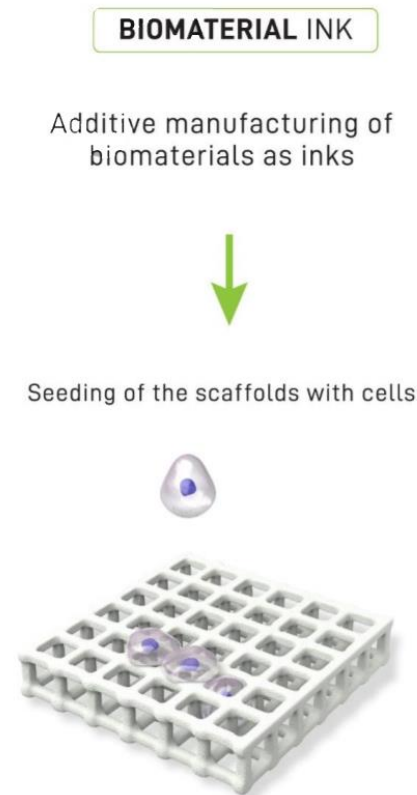
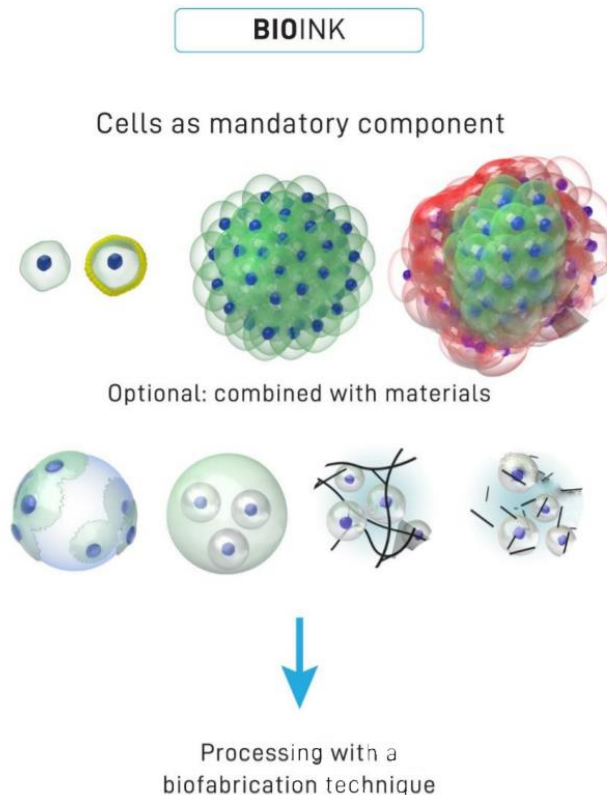
P, T, WS, viscosity
Dex, B-Gly
VEGF, BMP,



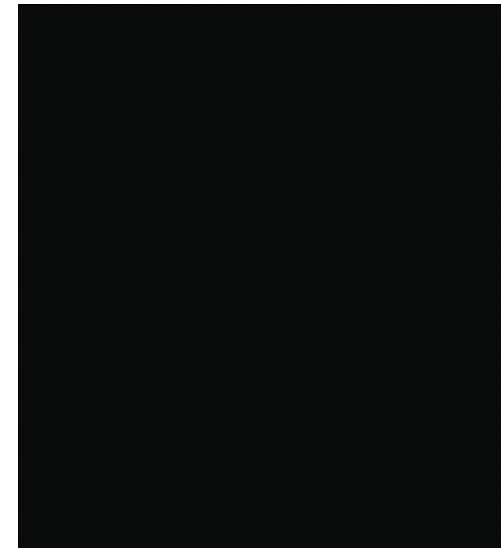
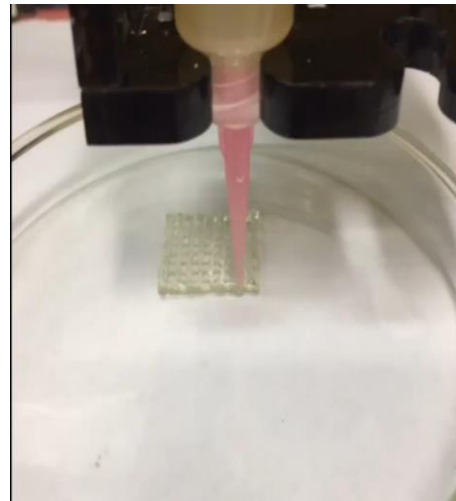
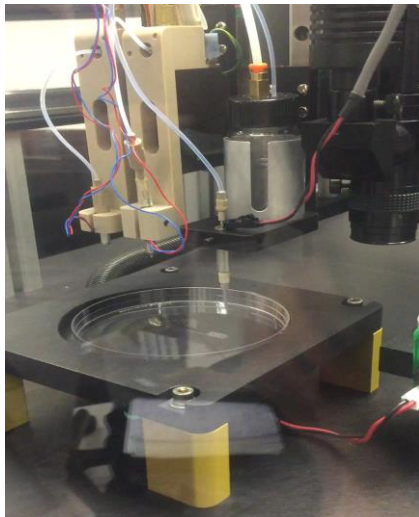
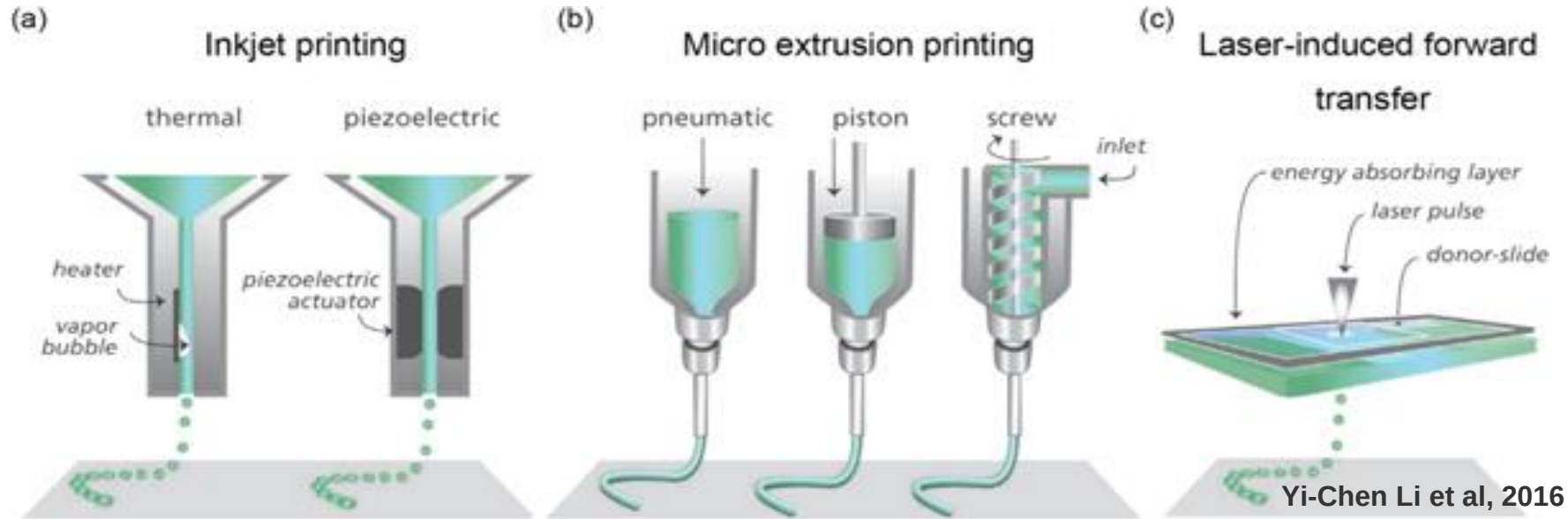
O que são Bioinks (biotintas)?

Bioink / Biotinta

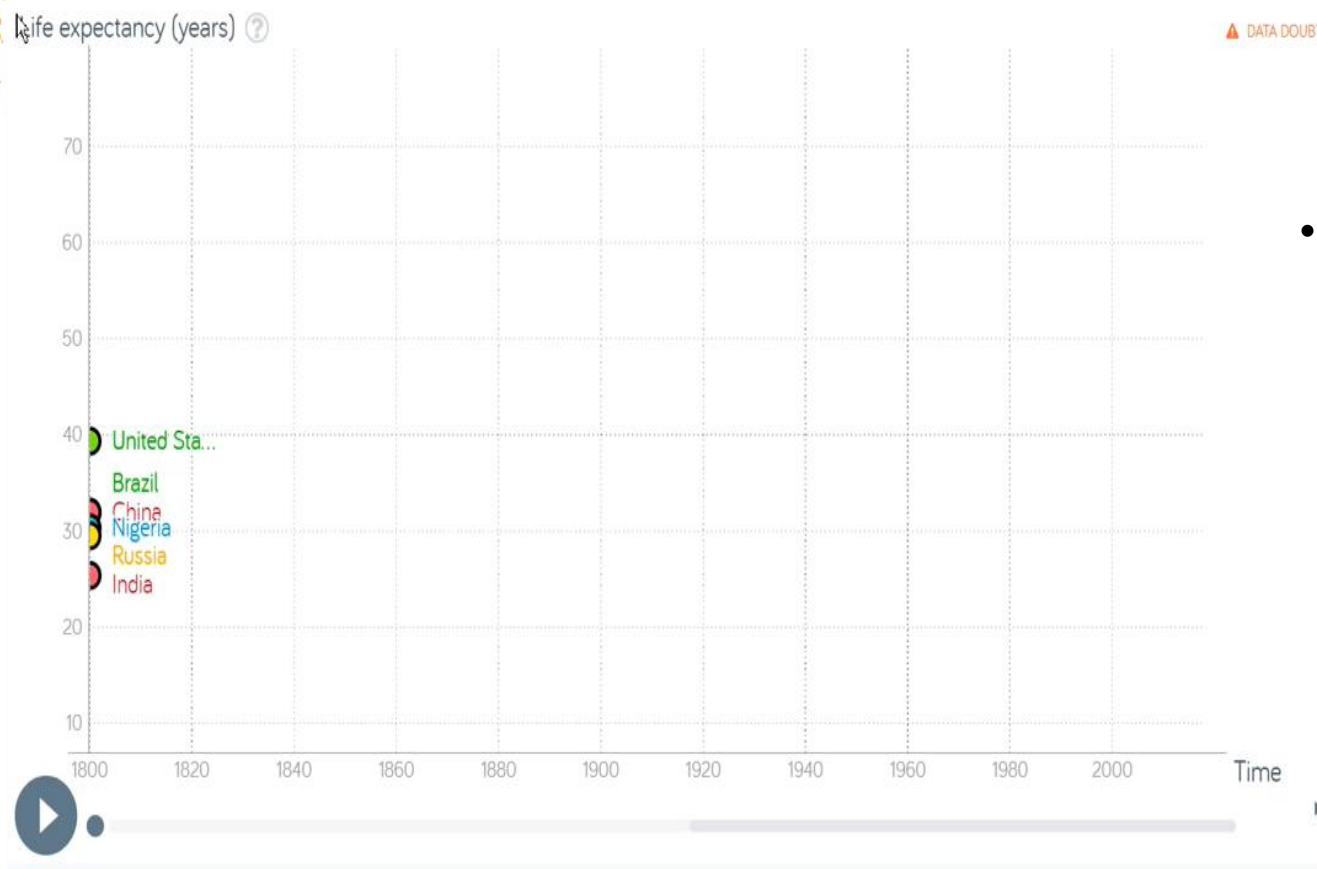
“Uma formulação de células para processamento utilizando uma tecnologia de biofabricação automatizada que também pode conter componentes biologicamente ativos e biomateriais”



Bioimpressoras – tecnologias existentes



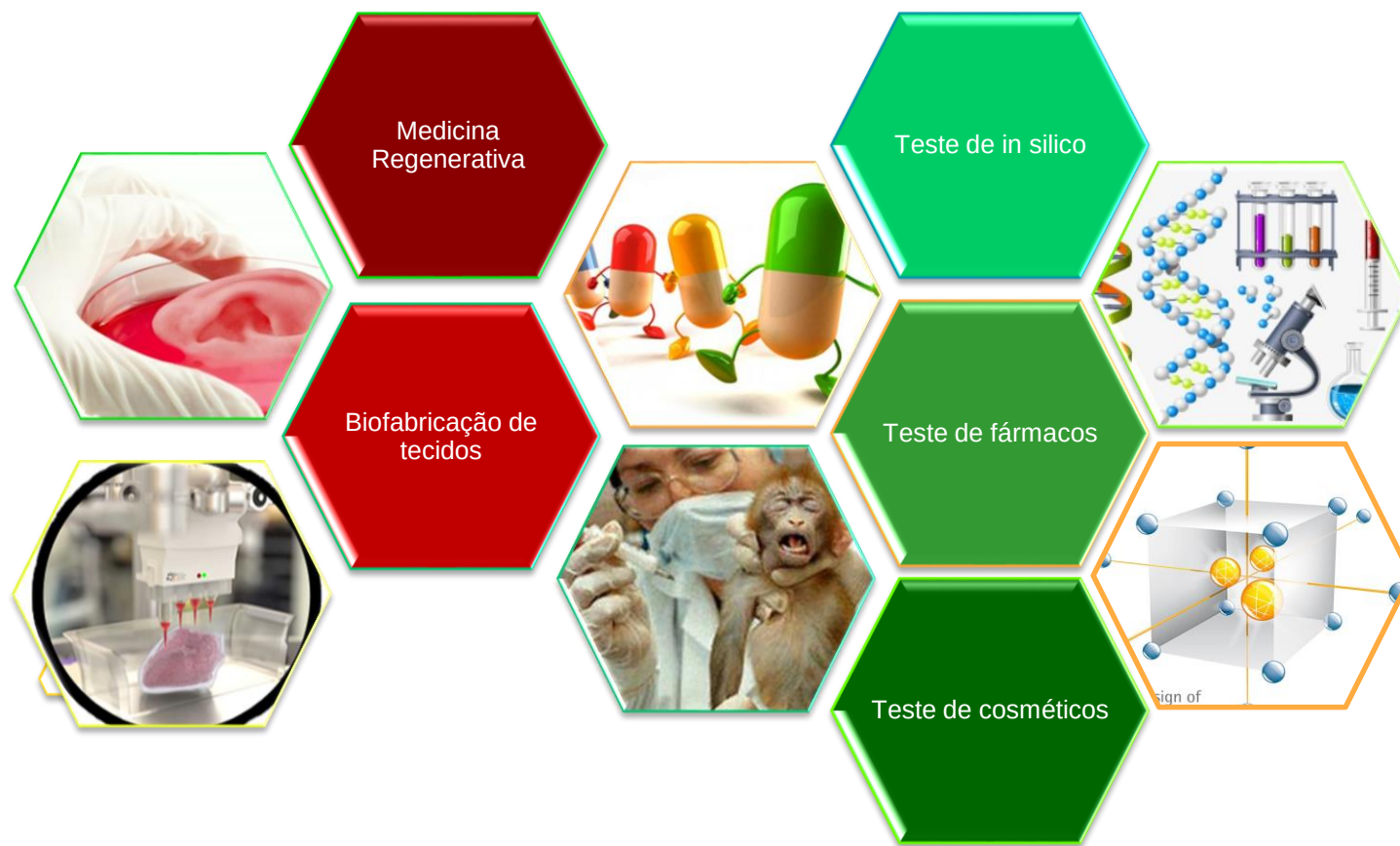
Motivação



- **Saúde**
 - Envelhecimento
 - Doenças
 - Traumas
 - Acidentes

Baixa qualidade de vida

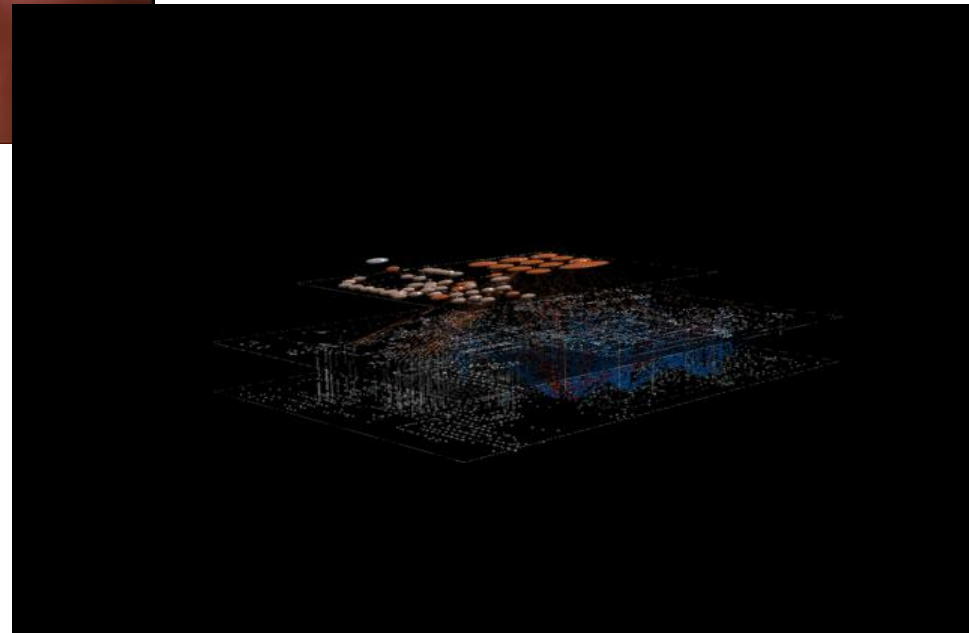
Motivação



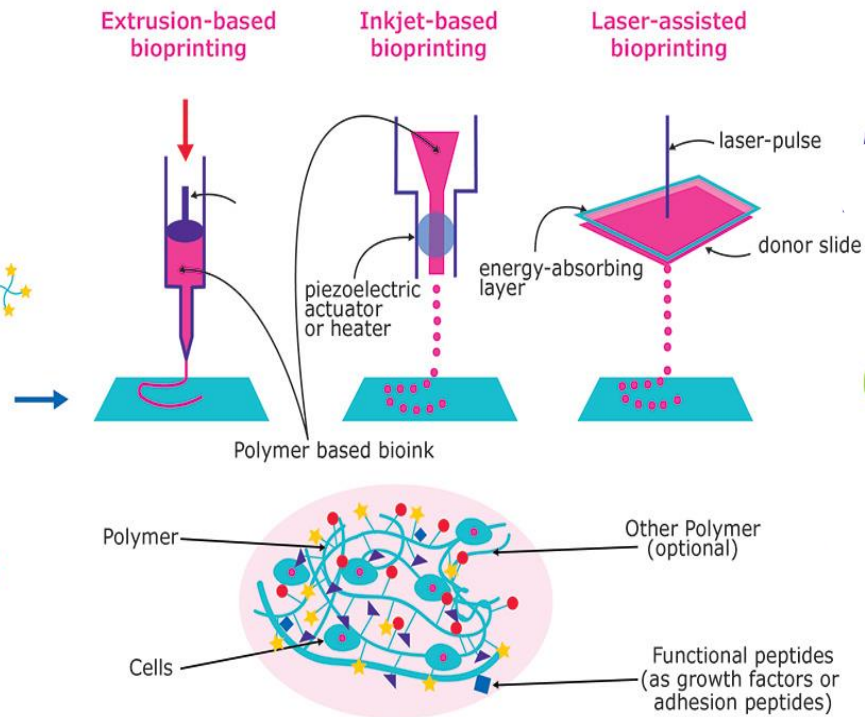
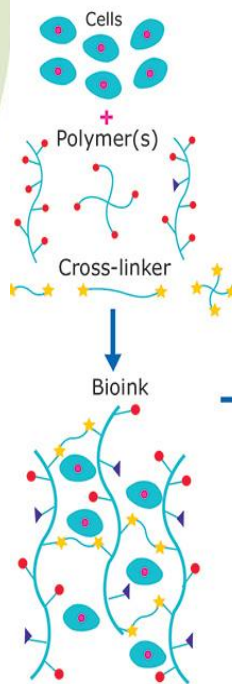
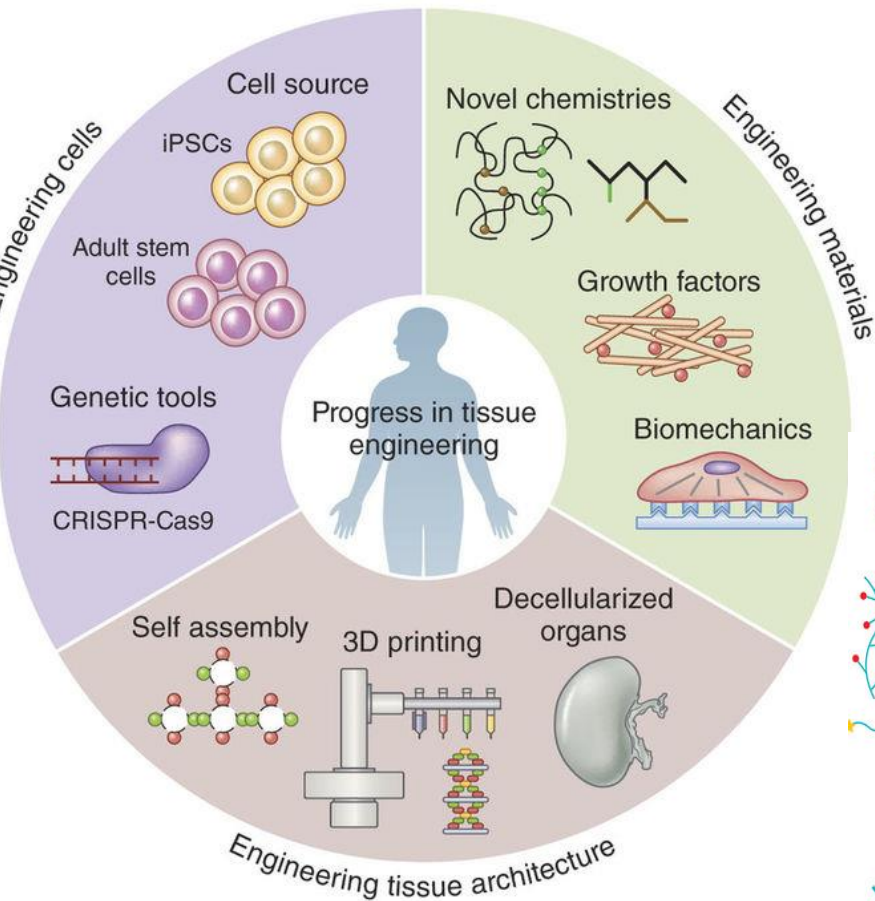
Complexidade e Desafios da área



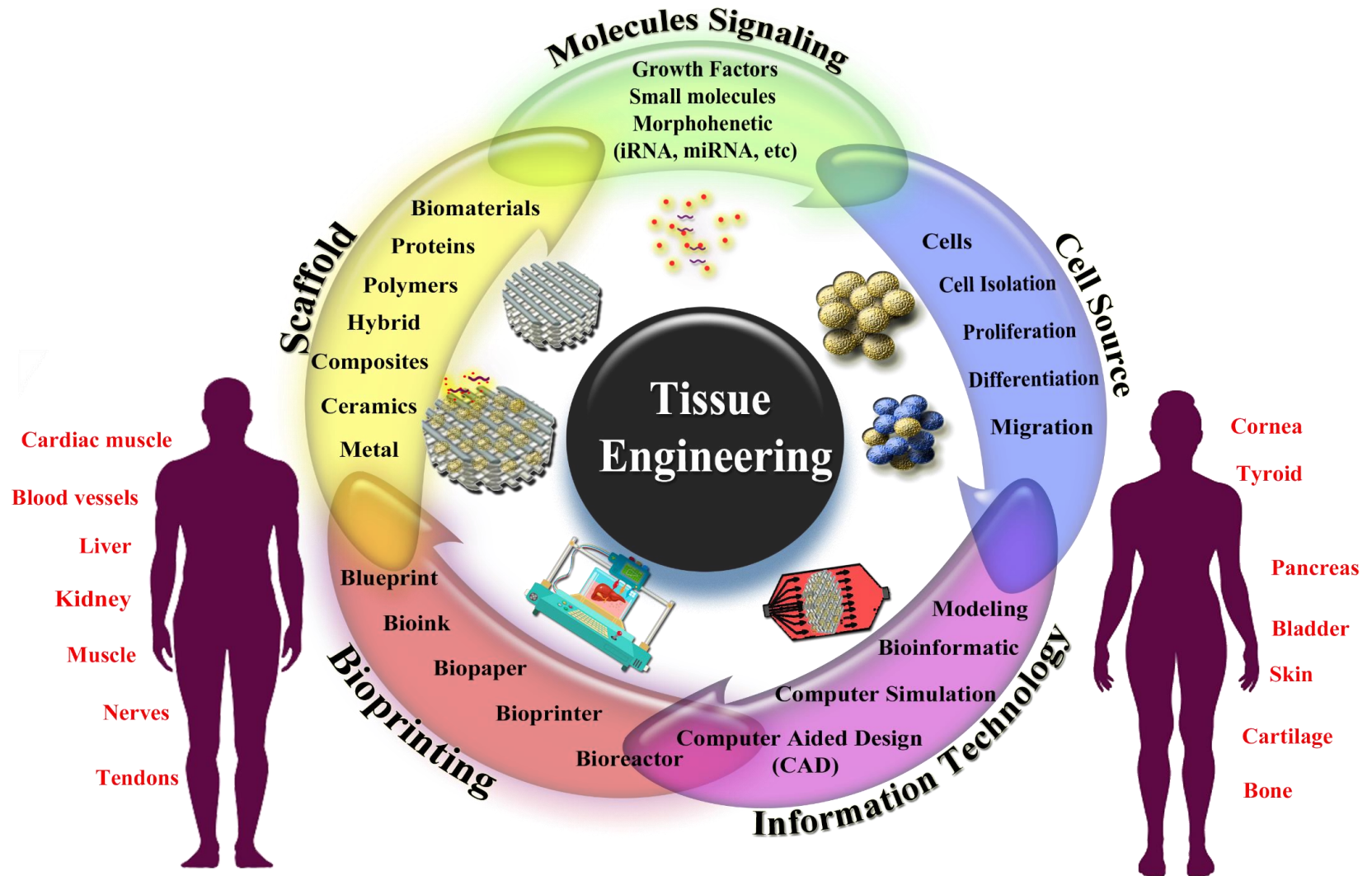
Integração de áreas



Complexidade e Desafios da área



Realidade x Futuro



Aplicações da Bioimpressão

Today

Tomorrow

In the future

Bioprinting of
tissues for
Education

Bioprinting of
tissues for
Medicine

Bioprinting of
organs for
transplantation

To replace
organs and
tissues that
suffered
damages

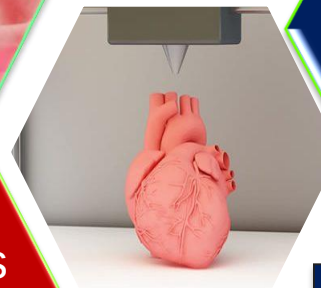
Drug
testing

to minimize
the use of
animals

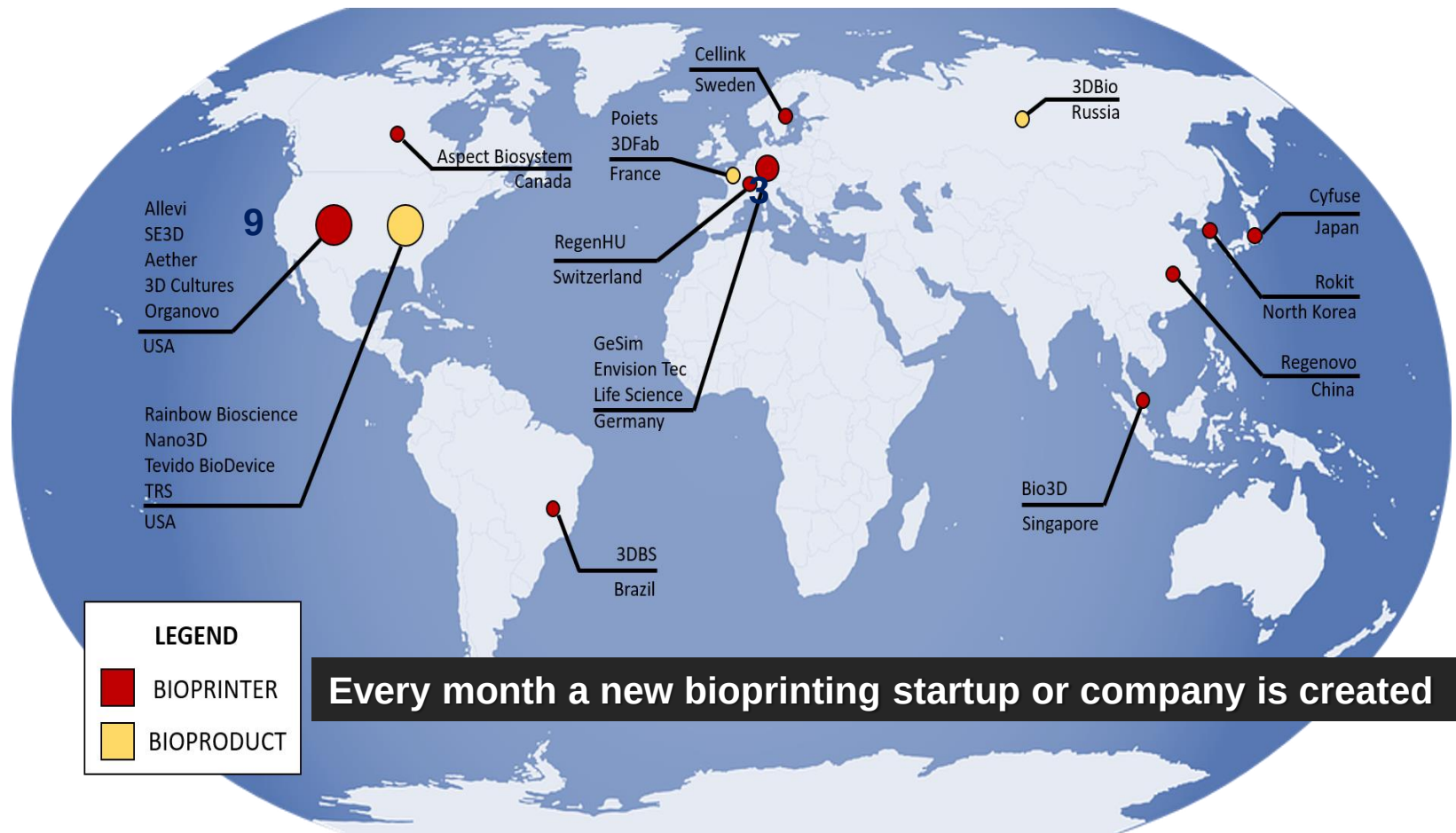
Cosmetics
testing

Medicine 4.0

Towards personalized medicine



Bioprinters and Bioproducts Companies



Desafios

Desafios Tecnológicos

BioCAD/Blueprint;
Modelagem biológica/BioCAE;
Software;
Bioimpressora;
Biorreator;
Interoperabilidade;
Escalabilidade.

Desafios Biológicos

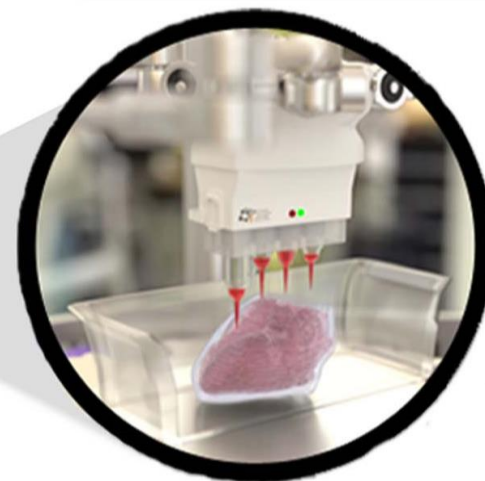
Biologia celular;
Modelagem da MEC;
Redes regulatórias funcionais
Estímulos biológicos (fatores de transcrição, epigenética, microRNA...);
Vascularização.

Desafios Químicos, Físicos e de Materiais

Estímulos químicos para a proliferação e diferenciação celular;
Biomateriais, materiais sintéticos e semi-sintéticos;
Estímulos físicos para modelagem tecidual.

Desafios éticos e de regulamentação

Bioética;
Regulamentação dos tecidos bioimpressos;
Regulamentação da segurança dos protocolos de pesquisa.





Projetos desenvolvidos no Brasil e no mundo sobre bioimpressão de tecidos

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI



AGÊNCIA ESPACIAL BRASILEIRA



CBPF

Centro Brasileiro de
Pesquisas Físicas



Centro de
Tecnologia da
Informação
Renato Archer



CETENE
CENTRO DE TECNOLOGIAS ESTRATÉGICAS DO NORDESTE



CNPEM
Centro Nacional de Pesquisa
em Energia e Materiais



CNEN



EMBRAPII
Empresa Brasileira de Pesquisa
e Inovação Industrial



INDÚSTRIAS NUCLEARES DO BRASIL



Centro de Gestão e Estudos Estratégicos
Ciência, Tecnologia e Inovação



CETEM
CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL



Cemaden
Centro Nacional de Monitoramento
e Alertas de Desastres Naturais



CEITEC S.A.
semiconductors



CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico



Finep
INOVAÇÃO E PESQUISA



Ibict
Instituto Brasileiro de Informação
em Ciência e Tecnologia

Instituto de Desenvolvimento
Sustentável Mamirauá



INPA

INSTITUTO NACIONAL DE
PESQUISAS DA AMAZÔNIA

INSTITUTO
NACIONAL DE
TECNOLOGIA



LNA
LABORATÓRIO
NACIONAL DE ASTROFÍSICA



MUSEU DE
ASTRONOMIA
E CIÊNCIAS AFINES



NUCLEP
NÚCLEOS EQUIPAMENTOS PESADOS S.A.



RNP
REDE NACIONAL DE
ENSINO E PESQUISA



INSTITUTO NACIONAL DE
MATEMÁTICA PURA E APLICADA



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS



INSTITUTO NACIONAL DO SEMIÁRIDO



Laboratório
Nacional de
Computação
Científica

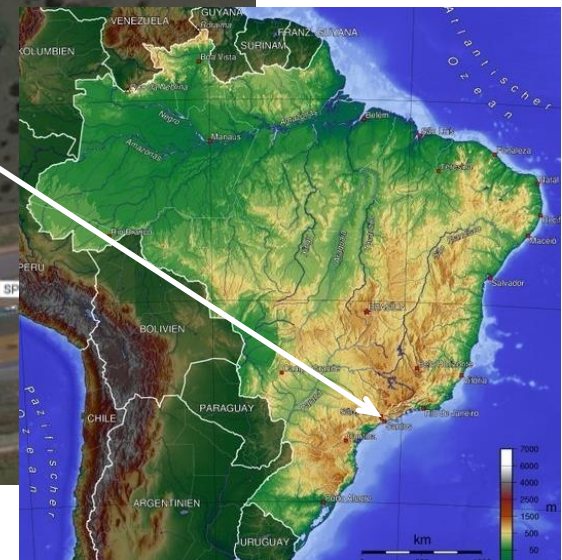


MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI



Observatório
Nacional

Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer– CTI
Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação -MCTI



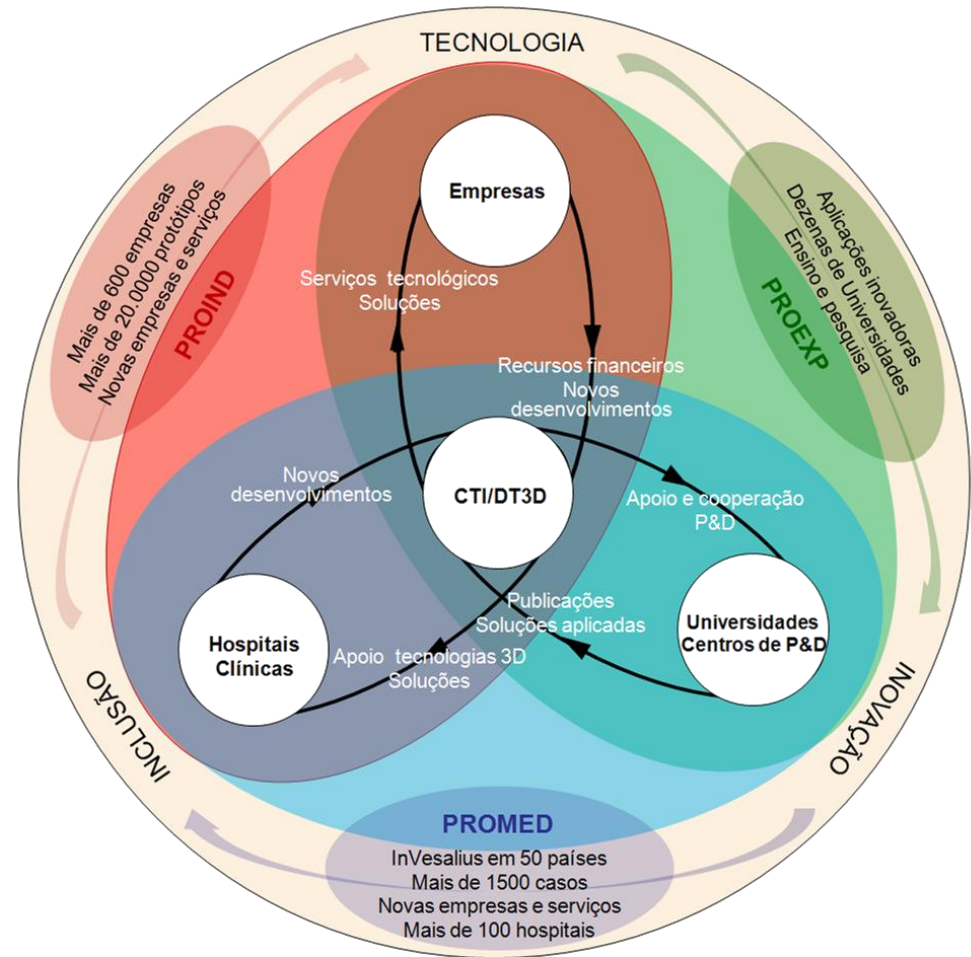
CTI Renato Archer

Missão

Pesquisar, desenvolver, utilizar e difundir tecnologias tridimensionais (virtuais e físicas), com foco na inovação e aplicações multidisciplinares orientadas pela sociedade

Parceiros

- Indústria (ProIND)
- Hospitais (ProMED)
- Universidades (ProEXP)



Impressão 3D: Conceitos

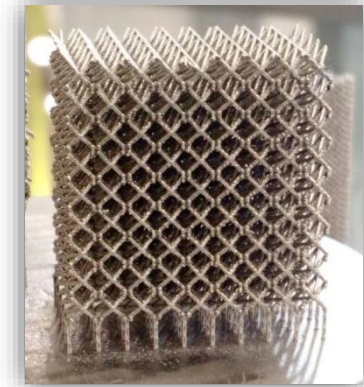
Definição de Impressão 3D ou Manufatura Aditiva (MA):

Conjunto de Tecnologias Aditivas Baseado na Construção por Camadas



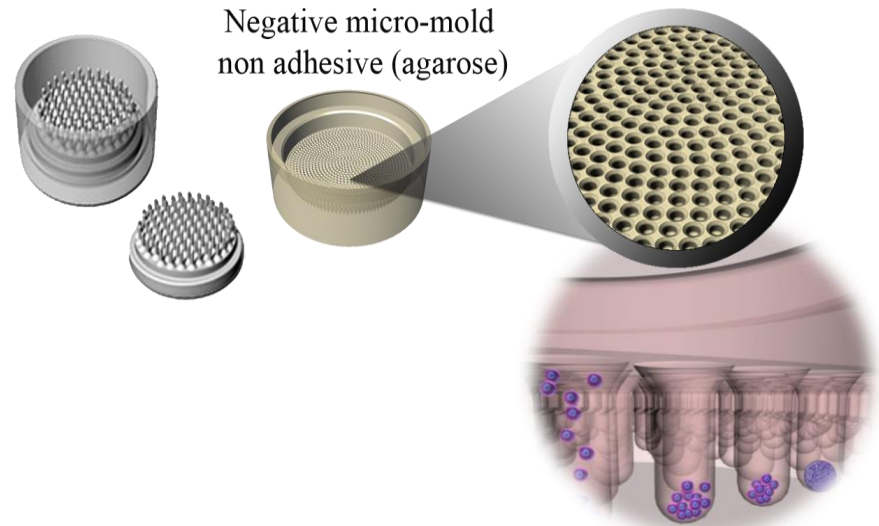
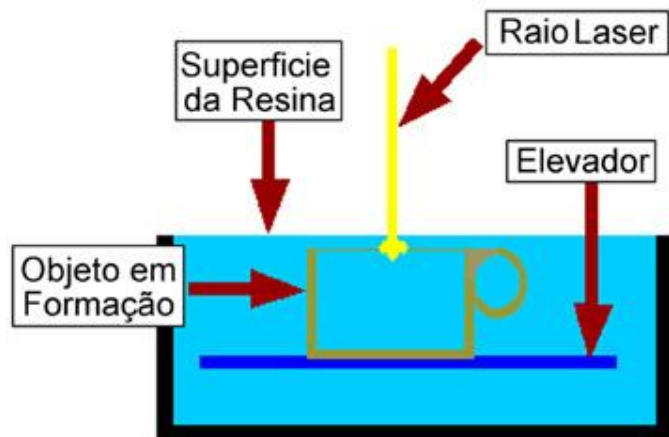
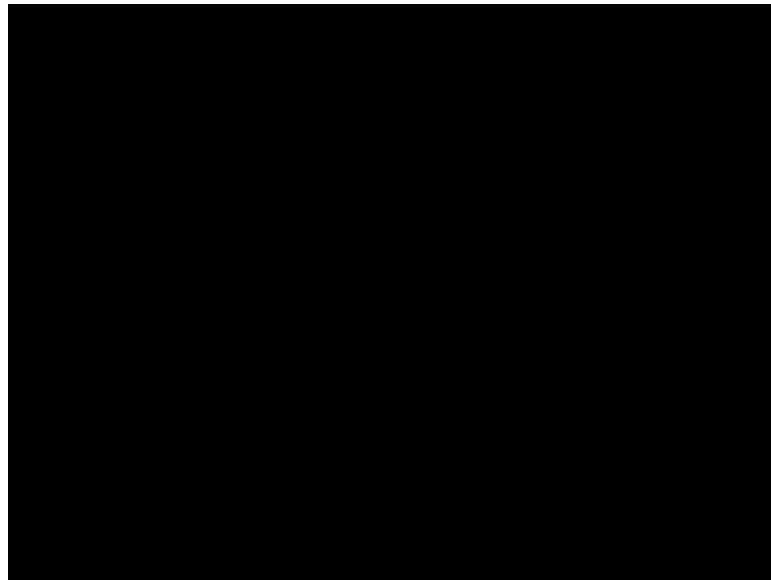
Tecnologias de Impressão 3D

EBM (Electron Beam Manufacturing)

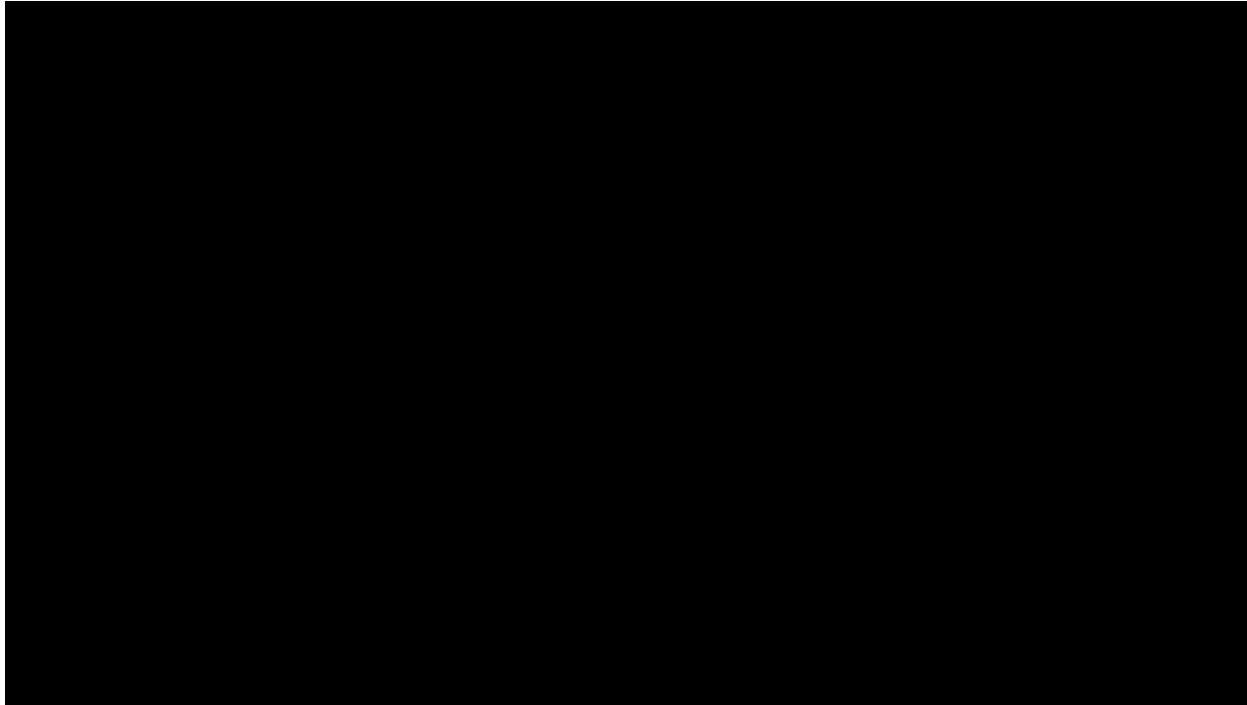


Tecnologias de Impressão 3D

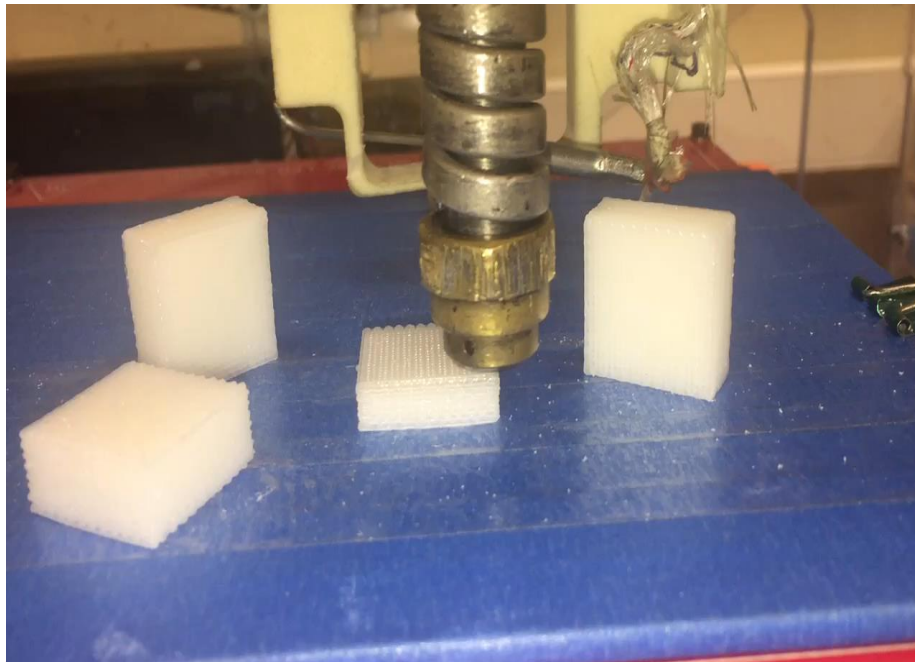
SLA (Stereolithography Apparatus)



Tecnologias de Impressão 3D



Trabalhos desenvolvidos no CTI



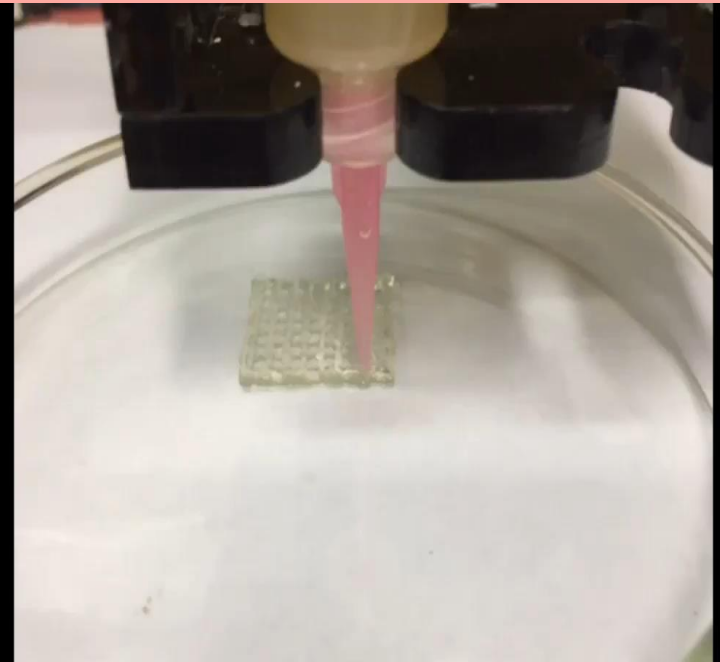
Hidrogéis

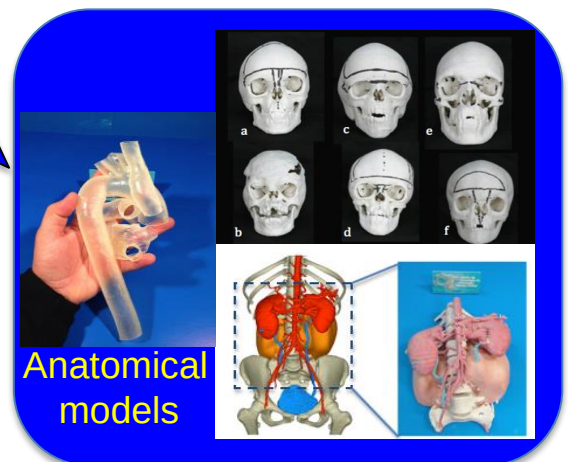
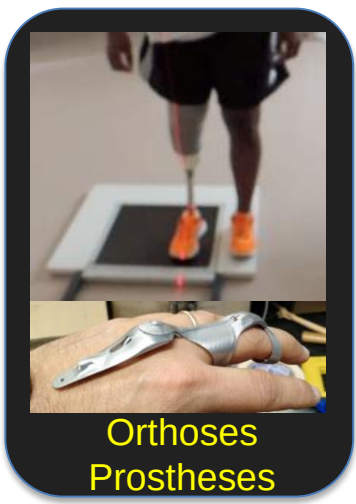
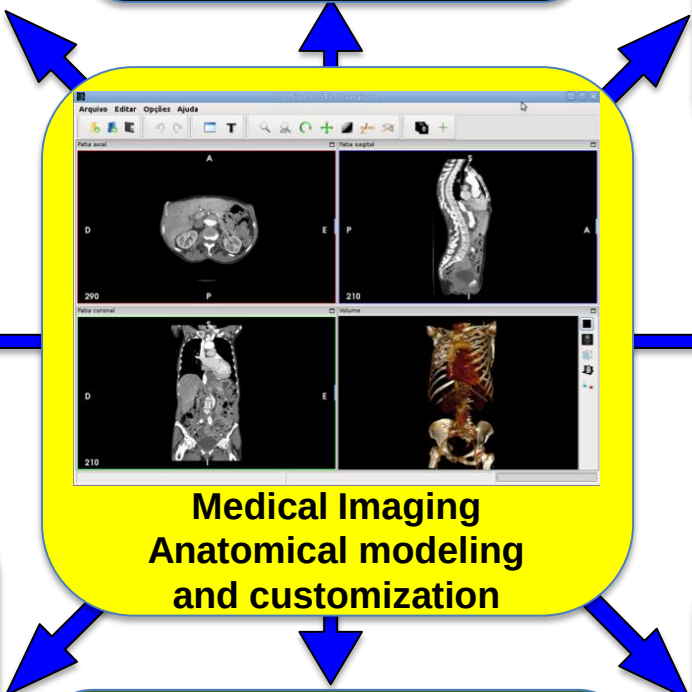
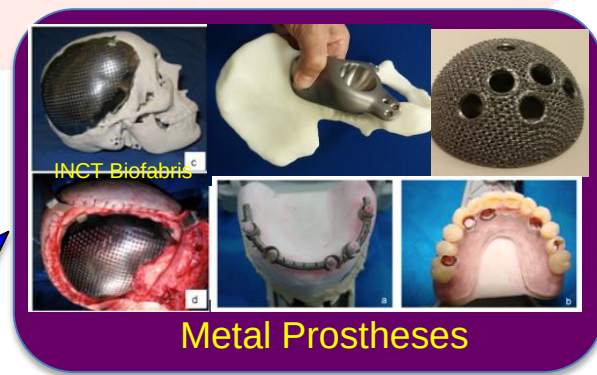
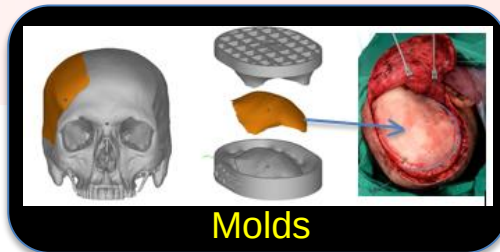
- Alginato + CaCl₂
- Colágeno – Gelatina
- Agar
- Pluronic
- **GelMA**

Bioimpressão de células em Hidrogel estruturado (suporte).

Produção de *scaffolds* rígidos utilizando biomateriais e materiais sintéticos biodegradáveis.

- PCL
- PLA
- PHB
- Biovidro
- B-TCP
- PCL + Biovidro
- PCL + Licopeno
- PCL +
- PHB + B-TCP
- PLLA
- PU
- HA





O uso da bioimpressão na Oftalmologia

FULL PAPER

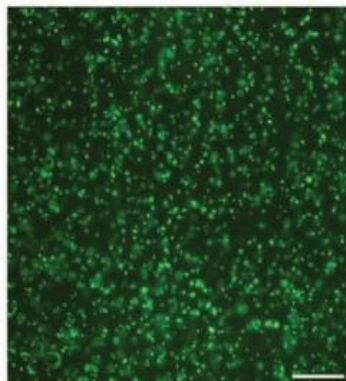
3D Bioprinted Corneal Endothelium

ADVANCED
HEALTHCARE
MATERIALS

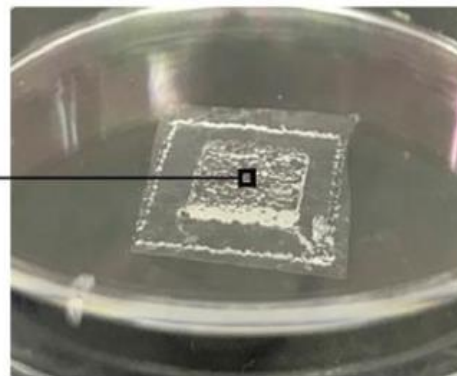
www.advhealthmat.de

Ex Vivo Functionality of 3D Bioprinted Corneal Endothelium Engineered with Ribonuclease 5-Overexpressing Human Corneal Endothelial Cells

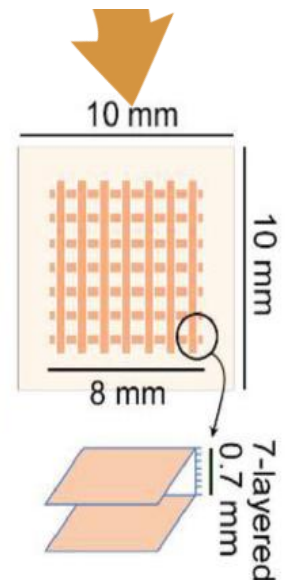
*Kyoung Woo Kim, Soo Jin Lee, Soo Hyun Park, and Jae Chan Kim**



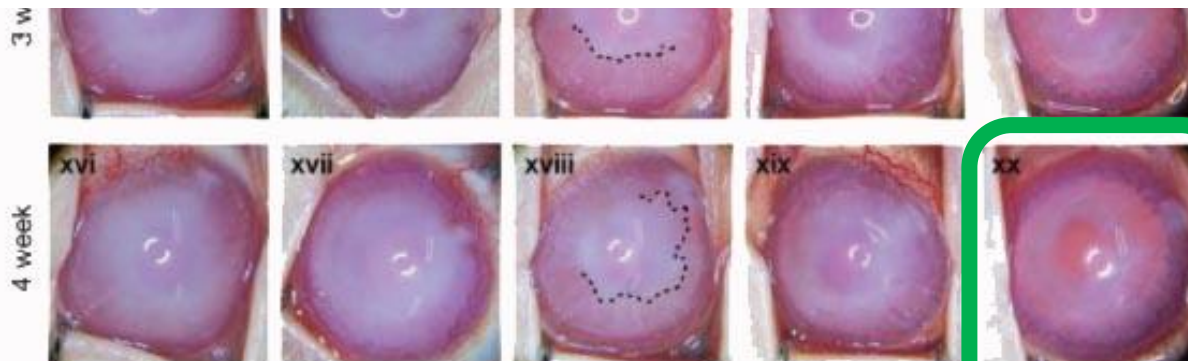
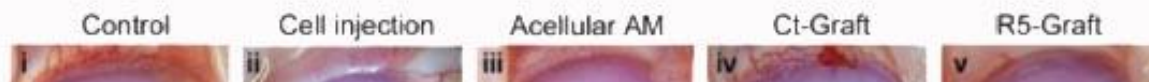
Live/Dead cell analysis



Cell seeding on lyophilized AM



O uso da bioimpressão na Oftalmologia



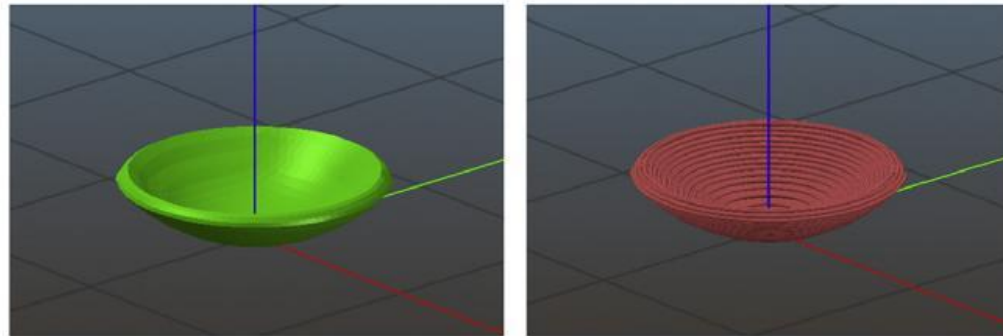
A membrana produzida foi preservada por 10 dias antes do transplante em coelhos e manteve a sua clareza. Após 2 semanas do procedimento cirúrgico a transparência da córnea começou a melhorar nos olhos do grupo com a membrana bioimpressa e alcançou completa clareza depois de 4 semanas, sem inflamação.

Embora os olhos do grupo controle também tenham mostrado melhora na transparência da córnea após 4 semanas foi inferior ao visto nos olhos do grupo bioimpresso. Especialmente, a claridade da córnea que apresentou aspecto semelhante ao da córnea normal, enquanto o da córnea do grupo controle ainda era muito edematosa

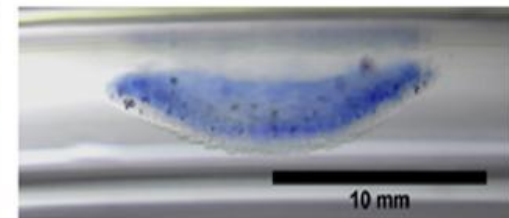
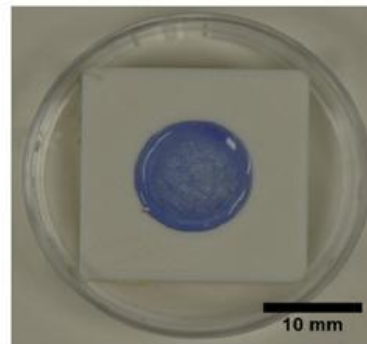
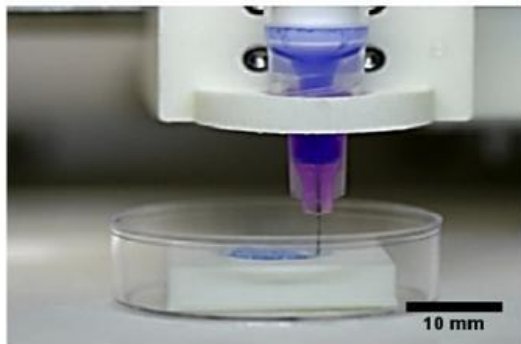
Bioimpressão de Estroma Corneano humano

Os pesquisadores usaram um modelo virtual 3D humano e uma estrutura de suporte adequada para a bioimpressão.

Modelo virtual 3D da córnea



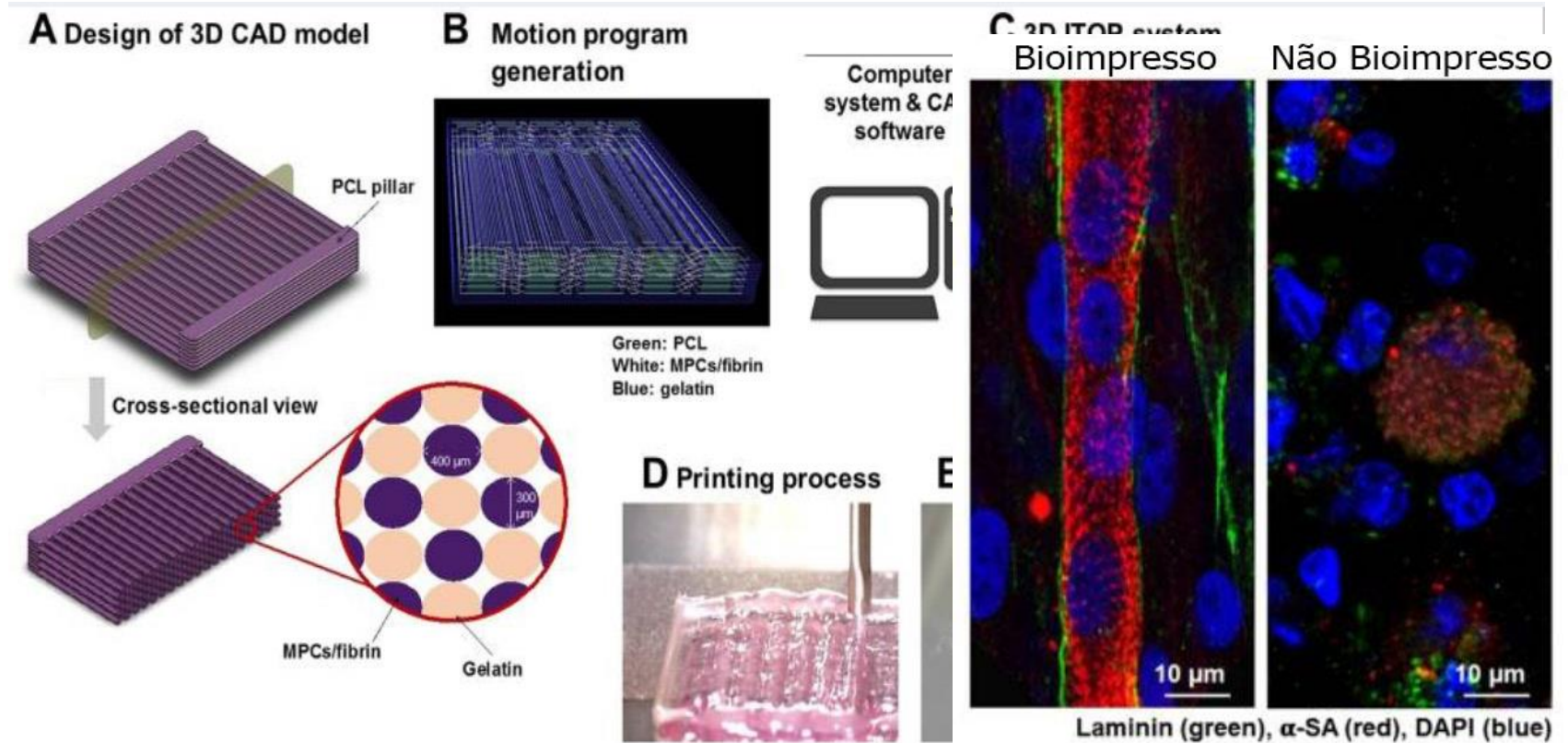
Bioimpressão do estroma corneano usando colágeno, alginato e células



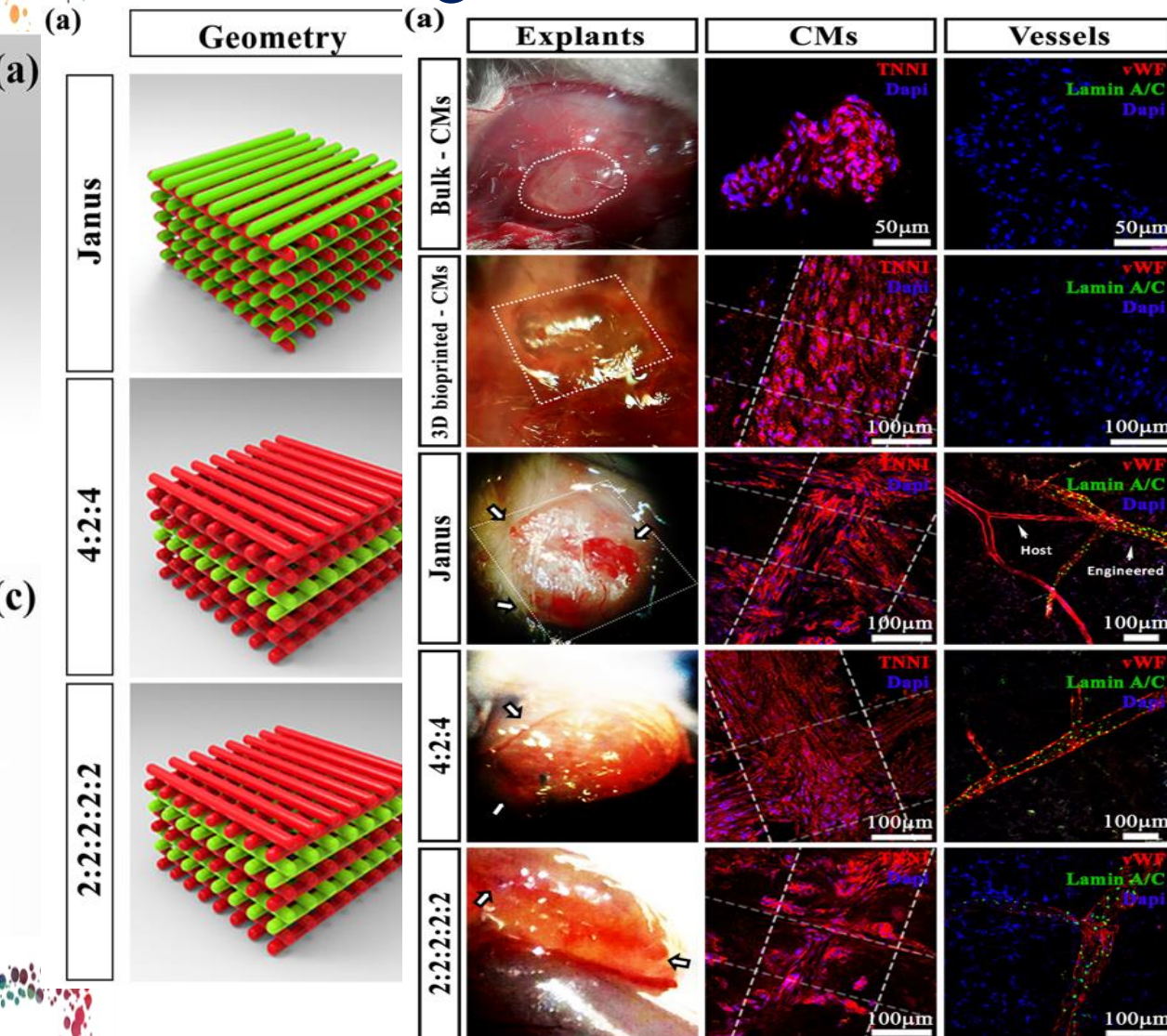
Isaacson A1, Swioklo S1, Cannon CJ2. 3D bioprinting of a corneal stroma equivalent.
Exp Eye Res. 2018 May 30;173:188-193.

Bioimpressão de músculo esquelético humano

- Pesquisadores da Escola de Medicina Wake Forest
- Hidrogel misturado com células progenitoras do músculo humano (hMPC),
- Hidrogel de gelatina,
- Polímero sintético biocompatível e biodegradável para um suporte (PCL) externo.



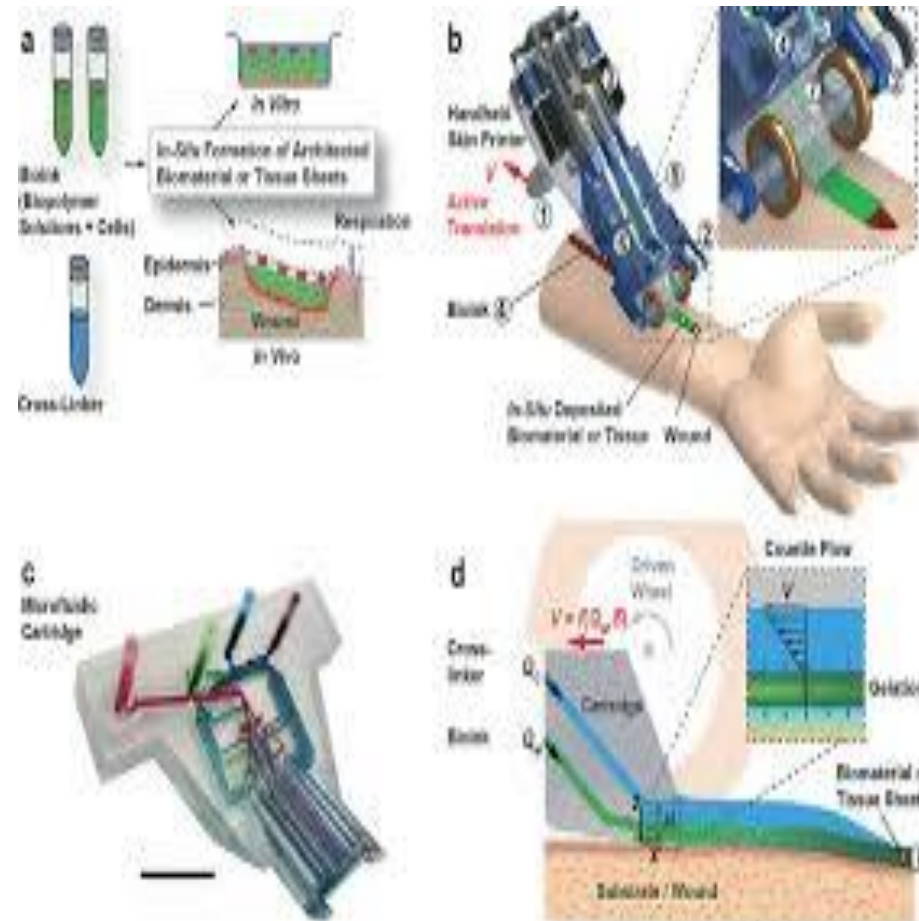
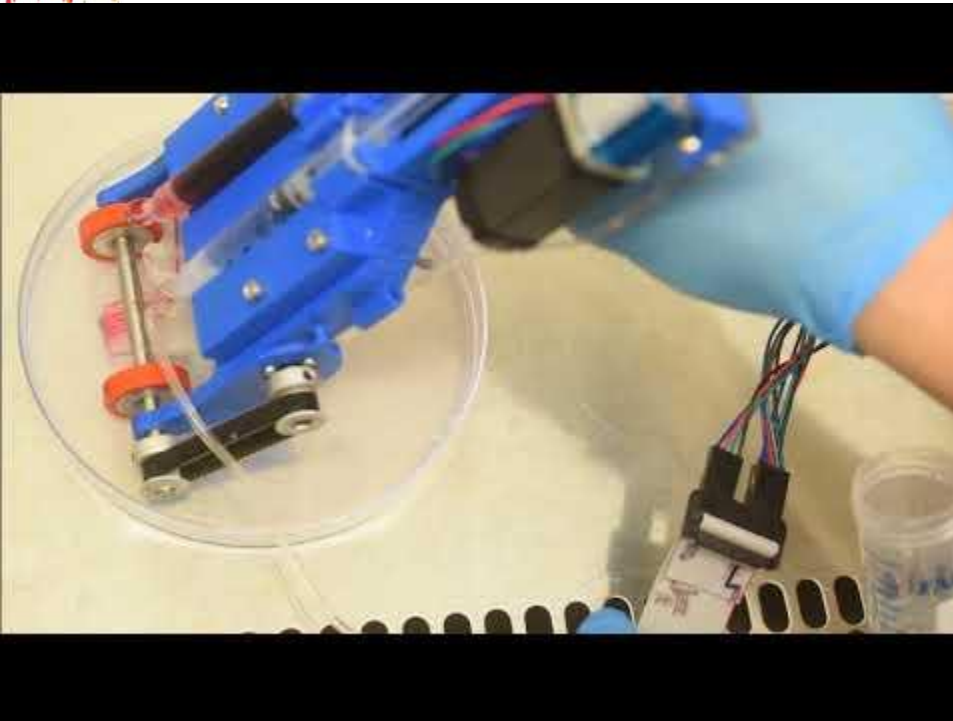
Bioimpressão 3D multicelular usando microfluídica para a engenharia de tecido cardíaco vascularizado



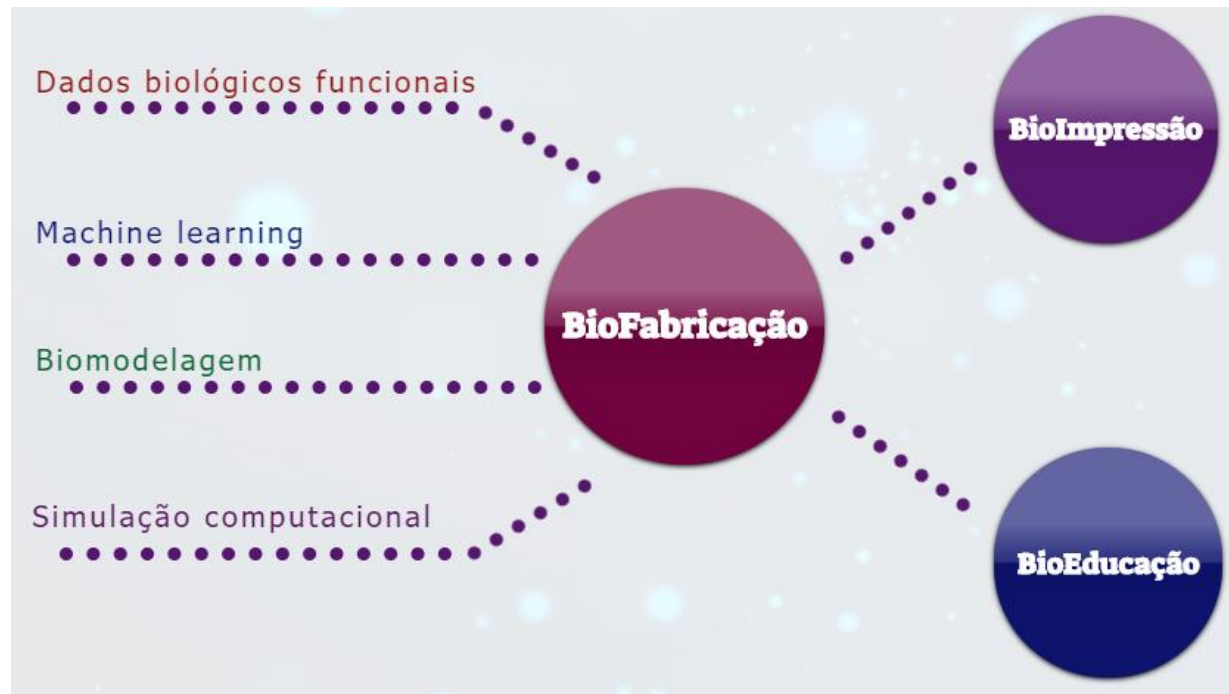
Construções heterogêneas e multicelulares, compostas de:

- células endoteliais da veia umbilical humana (**HUVECs**)
- cardiomiócitos derivados de células pluripotentes induzidas (**iPSC - CMs**).
- hidrogel contendo **alginato** e **polietileno-glicol**

Handheld 3D printer



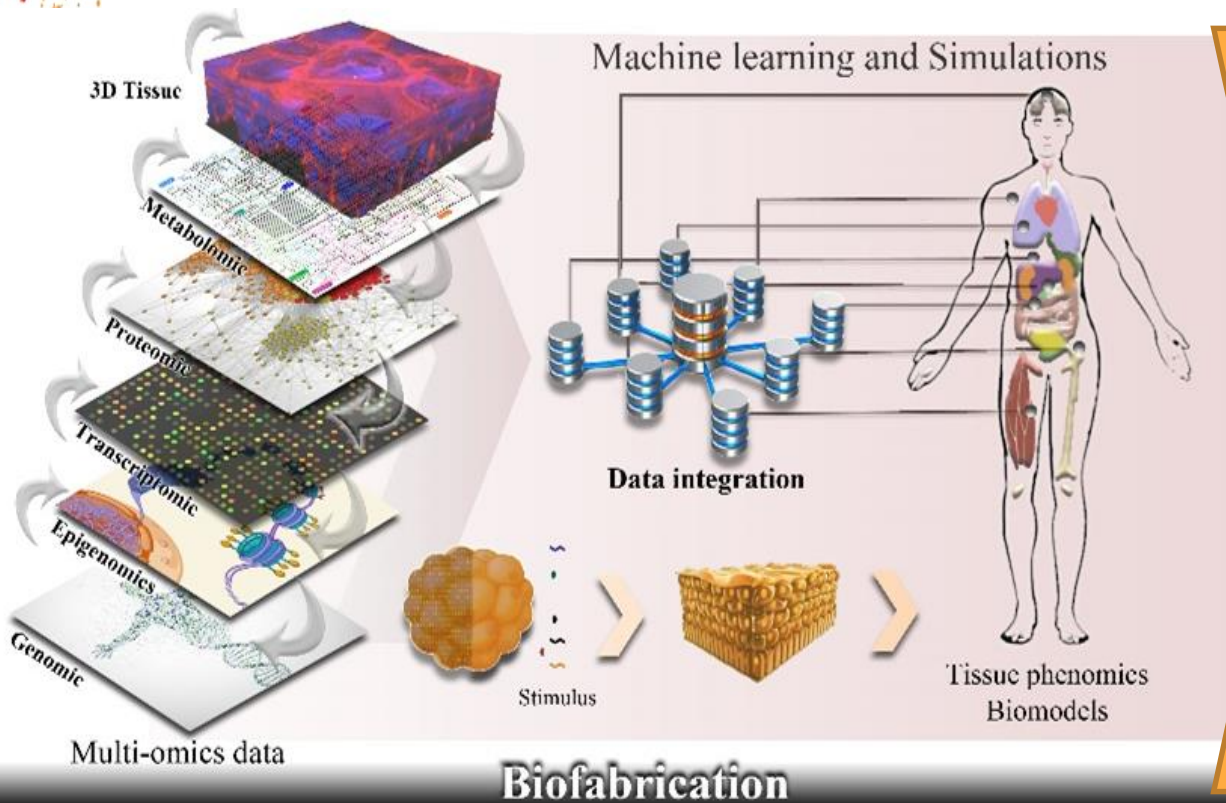
BioData



Biomodelos Preditivos

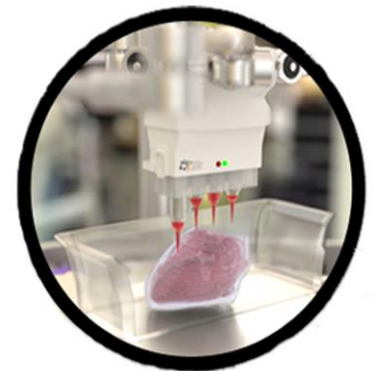
Frameworks / Blueprint / BioCAD

Machine Learning



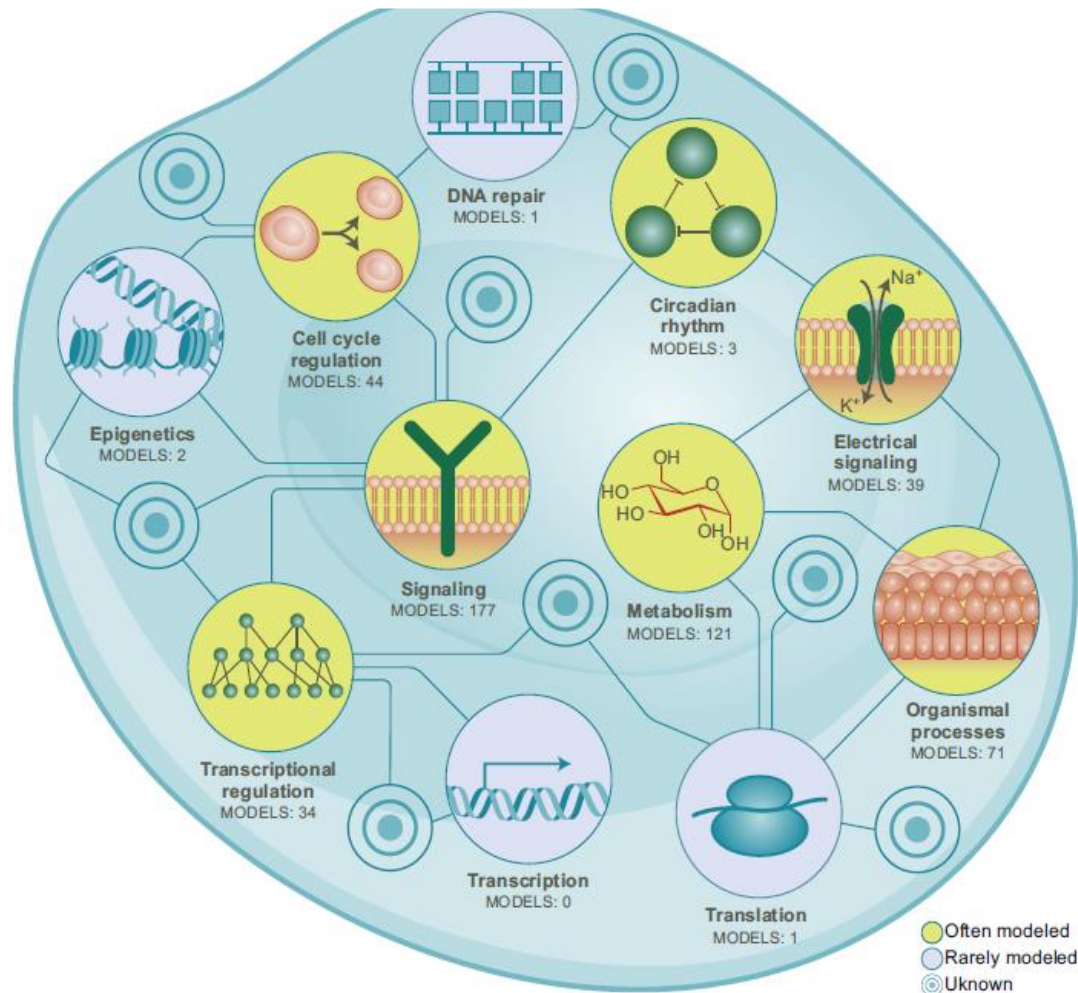
Framework

- Desenvolvimento do tecido ósseo,
- Cartilaginoso
- Tecido corneano
- Muscular,
- Hepático,
- Cardiovascular



Blueprint / BioCAD

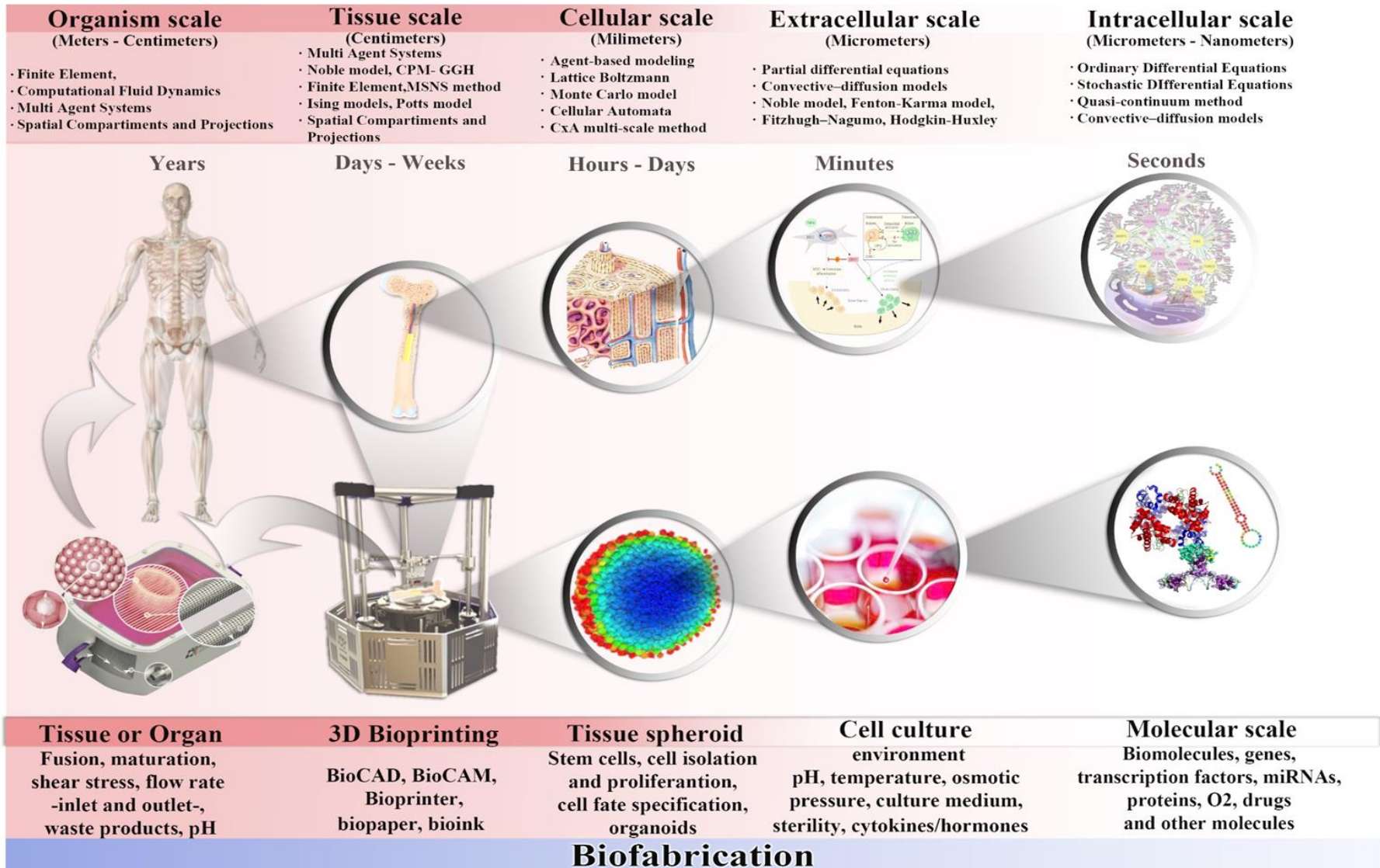
Biomodelagem



A habilidade de reproduzir as características funcionais e morfológicas de estruturas biológicas em um modelo virtual /físico.

A blueprint for human whole-cell modeling Szigeti et al, 2018.

Por que Simular na Biofabricação e Bioimpressão?



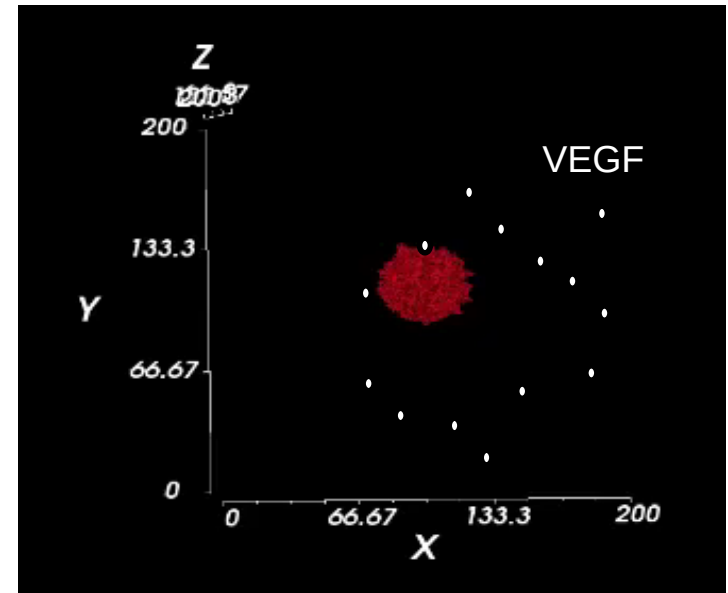
Biomodelos Preditivos de Fenômenos Biológicos



O que podemos simular:

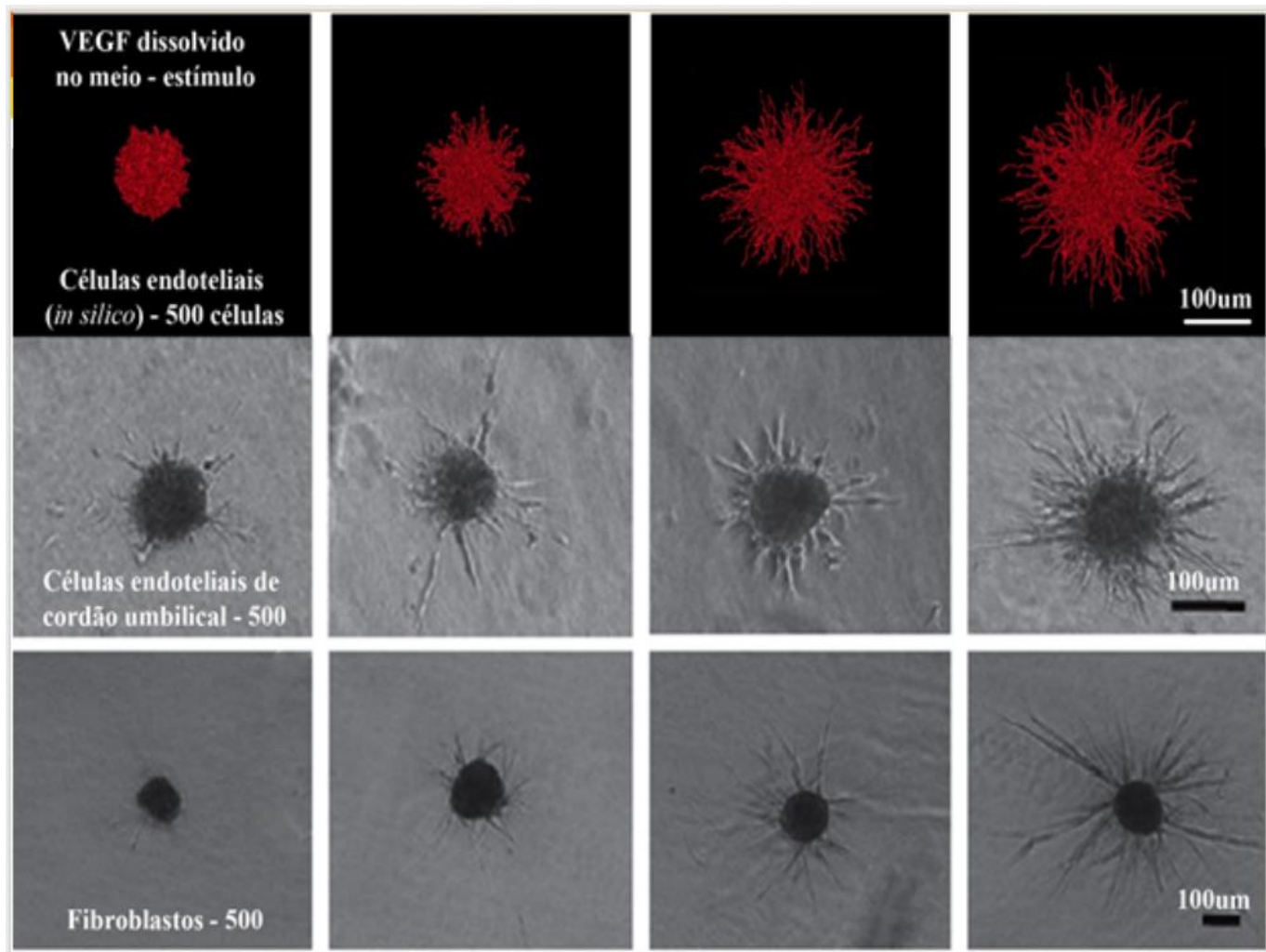
- A proliferação celular
- A diferenciação celular
- A migração celular
- A apoptose celular
- **A sinalização intra e extracelular**

Quimiotaxia → mudança de orientação de células em resposta a um estímulo químico



Esferoide de Células Endoteliais

Biomodelos Preditivos de Fenômenos Biológicos



Biomodelos preditivos para a Biofabricação e Bioimpressão

Comportamento Celular e Bioquímico Simulado

- Proliferação celular
- Vascularização
- Difusão molecular
- (VEGF e Nutrientes)

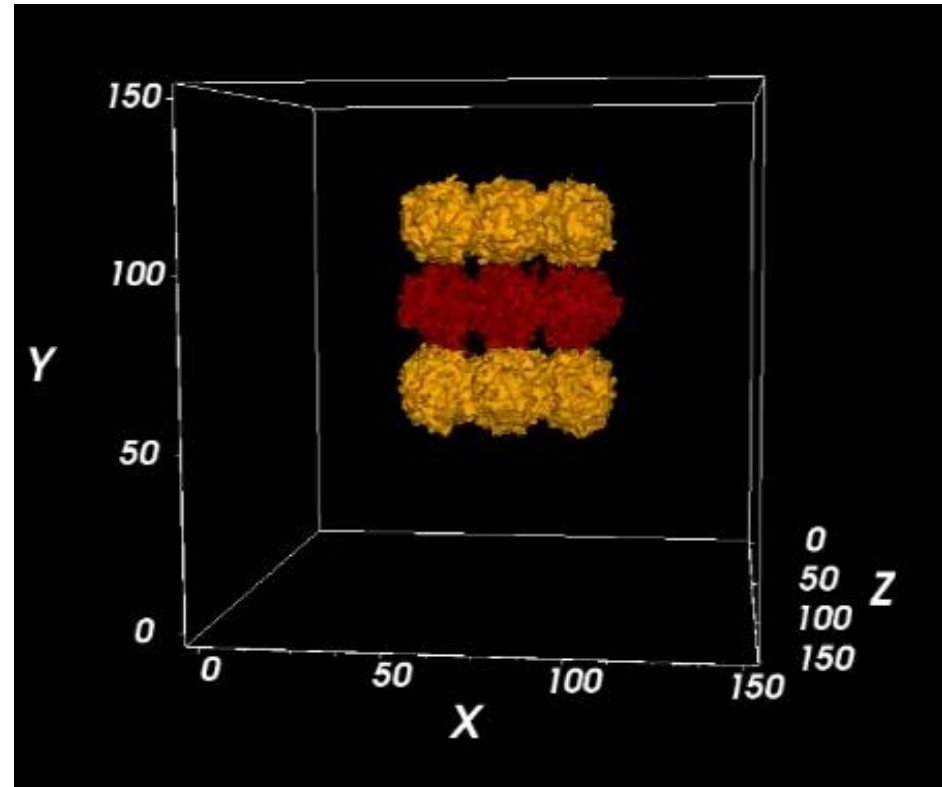
Esferoides



Células proliferativas = Células tronco



Células Endoteliais → vascularização



Por que ainda não temos órgãos funcionais “bioimpressos”?

- ✓ Integration Engineering x Life Sciences;
- ✓ To understand the regulatory networks of cells and tissues;
- ✓ Development of new “Blueprint/BioCAD” for bioprinting;
- ✓ Development of scalable technology for biofabrication millions uniform tissue spheroids;
- ✓ Development of integrated operational system integration of the bioprinters (special software-hardware);
- ✓ Development of new bioreactor;
- ✓ Development of *in situ* bioprinting;
- ✓ Development of bioprintable biomaterials;
- ✓ Laws and regulations → * Safety + Security

<http://www.biofabricacao.com>

obrigada

Janaina Dernowsek, PhD

Pesquisadora colaboradora do CTI Renato Archer

jadernowsek@gmail.com

Bio3Data

Idealizadora

bio3data@gmail.com

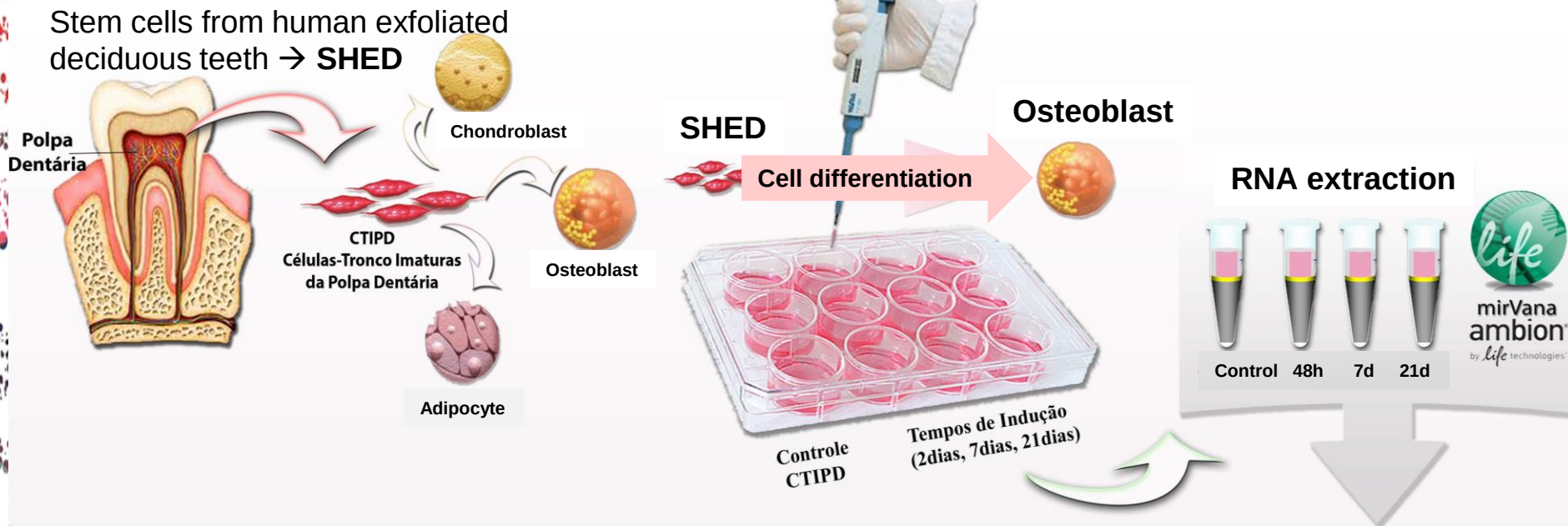
Ph.D - USP

Journal of Cellular Biochemistry

Article

Posttranscriptional Interaction Between miR-450a-5p and miR-28-5p and STAT1 mRNA Triggers Osteoblastic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells

Janaína A. Dernowsek, Milena C. Pereira, Thaís A. Fornari, Claudia Macedo, Amanda F. Assis, Paula B. Donate, Karina F. Bombonato-Prado, Maria Rita Passos-Bueno, Geraldo A. Passos



Methodologies

Assays functional

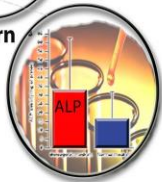


Controle
Induzidas
Controle + mimic miRNA
Controle + Anti-miRNA
Induzidas + mimic
Induzidas + Anti-miRNA

**MicroRNA
Silencing and
Overexpressing
miR450 and miR28**



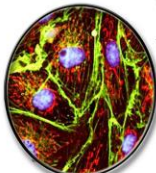
Western blot



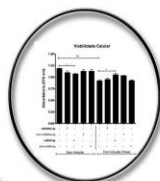
Alkaline phosphatase



Alizarin red staining



Immunohistochemistry
ALP and OC



Viability assay
Proliferation
MTT

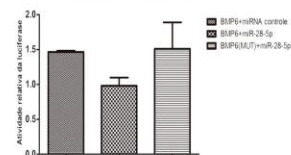
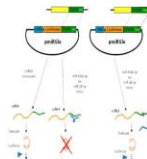
Interaction network miRNA-mRNA

Algoritmo GenMir ++ e Cytoscape



miRNAs e mRNAs
Diferenciamente expressos

Luciferase assay



Validation of the interactions of
miR-450a and miR-28-5p and mRNAs (BMP6, STAT1)



Agilent Technologies



MicroRNA-microarray
(8x15K formato)



Whole-human
genome microarray
(4x44K formato)



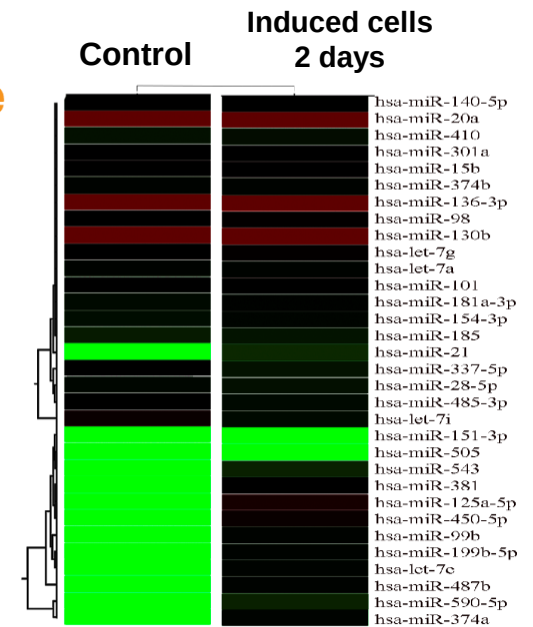
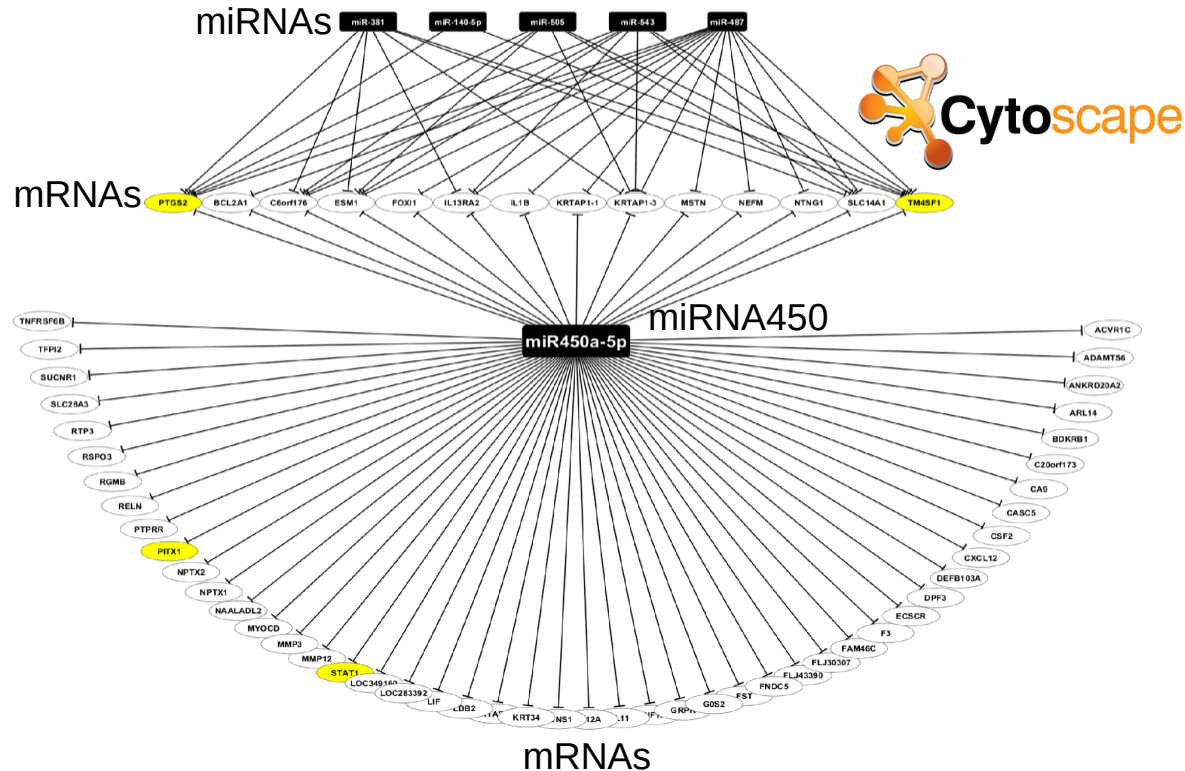
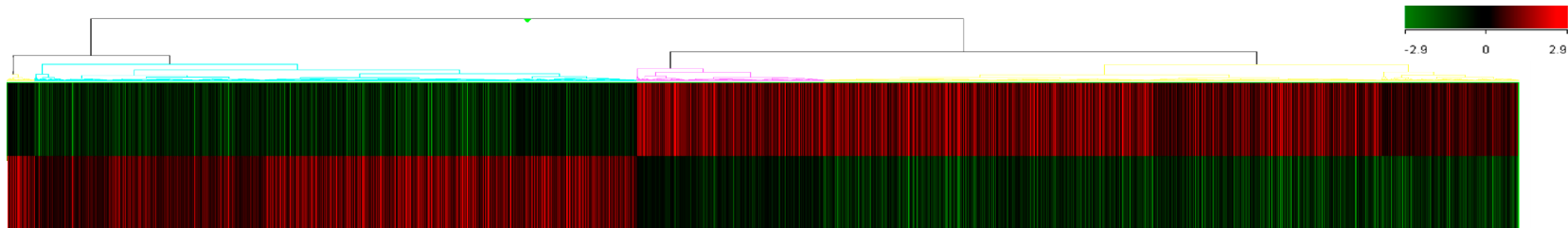
Análise Estatística



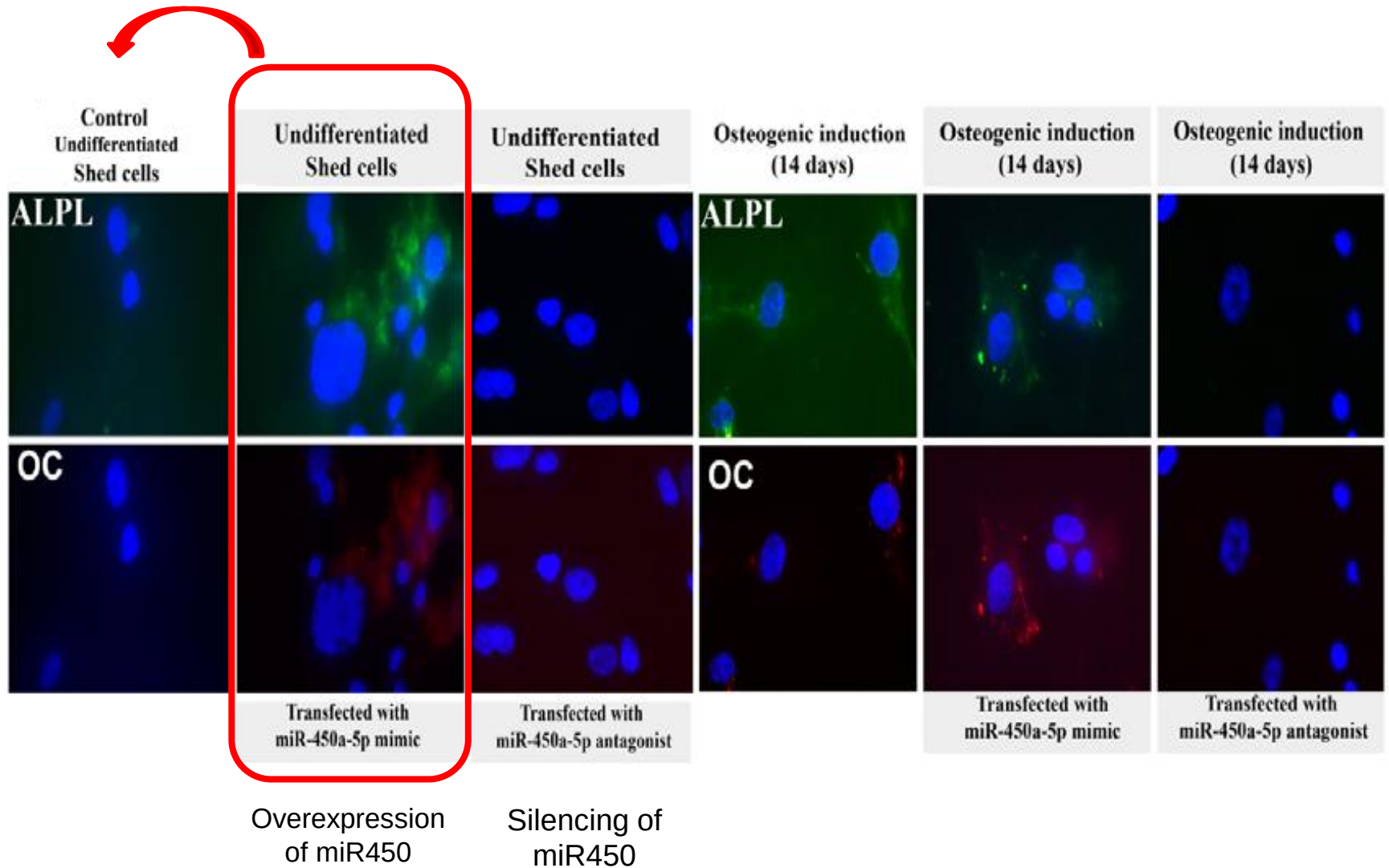
Escaneamento
(Feature Extration)

[illegible]

Induced cells
2 days



Immunolocalization of alkaline phosphatase (ALPL) and osteocalcin/BGLAP (OC) protein in SHED cells

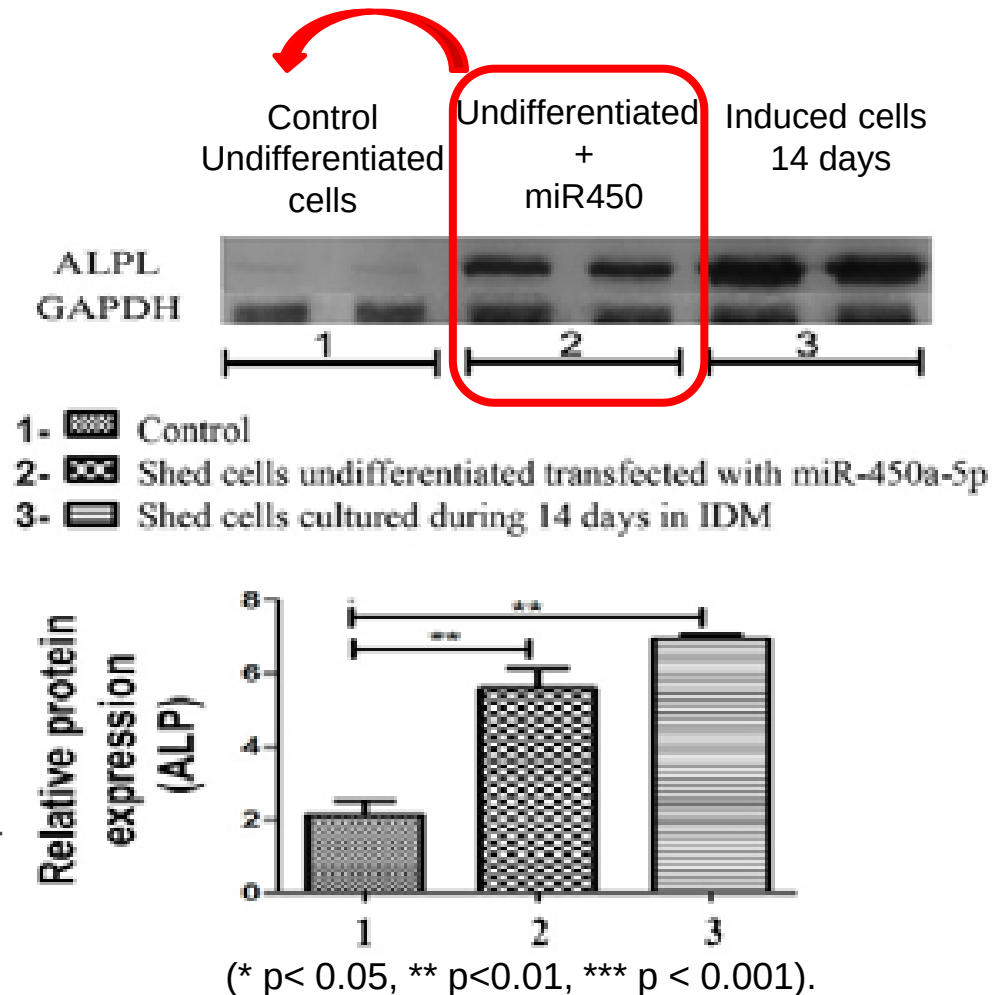


Wester blot → ALPL – miR-450a-5p

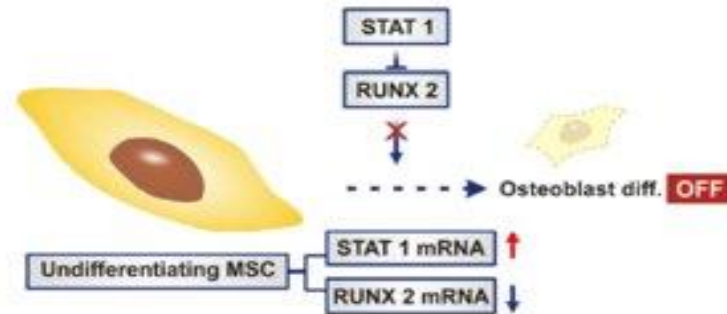
Expression of alkaline phosphatase (ALPL) protein in SHED cells subjected (or not) to osteoblastic induction as analyzed by **western blotting**.

SHED cells were cultured in control medium (CMD) or in induction medium (IMD) during **14 days** and transfected (or not) with miR-450a-5p mimic.

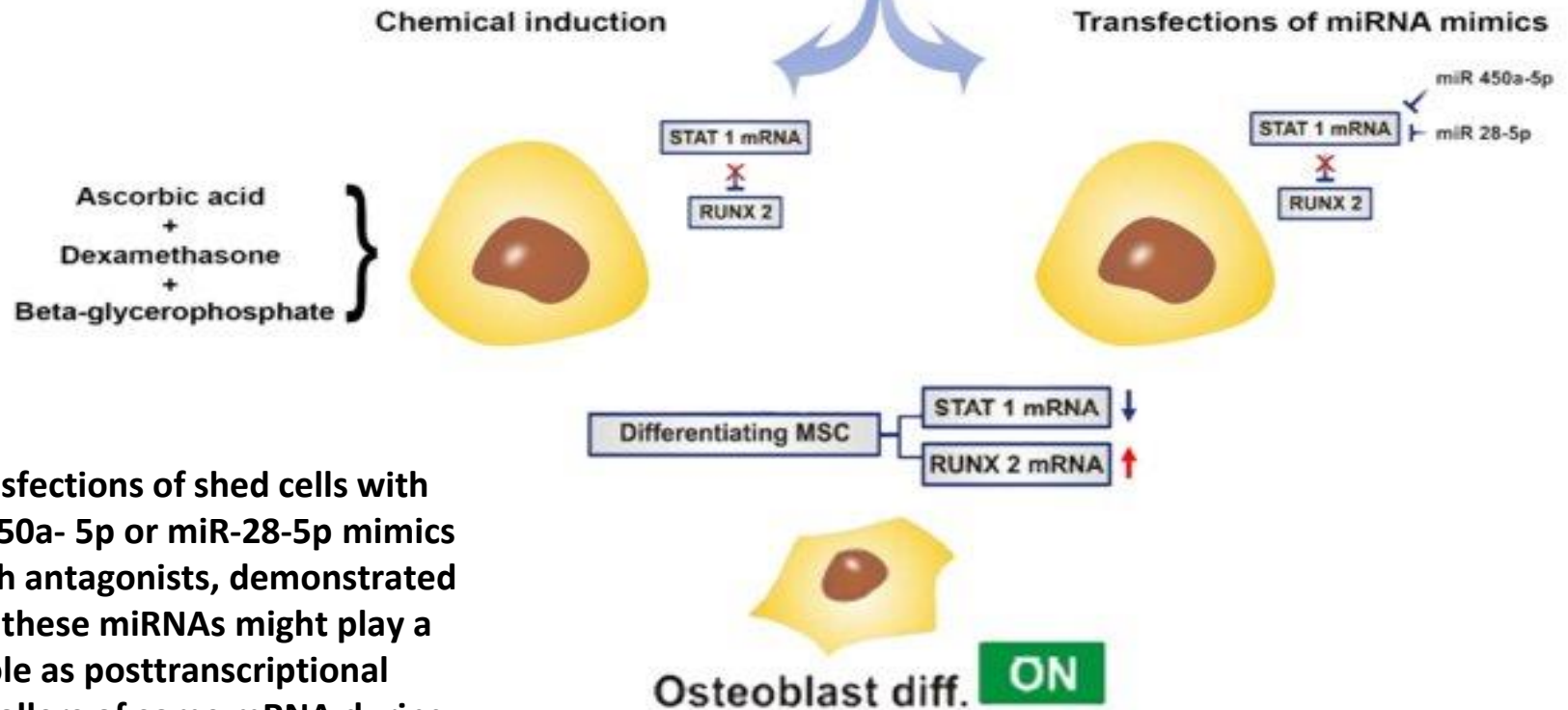
Western-blot for ALPL or for GAPDH (used to normalize data). Bar graphs resulted from quantification of western-blot bands show the effect of miR-450a-5p mimic transfection on ALPL expression..



Conclusion



Osteoblastic differentiation



Transfections of shed cells with miR-450a- 5p or miR-28-5p mimics or with antagonists, demonstrated that these miRNAs might play a role as posttranscriptional controllers of some mRNA during osteoblastic differentiation.